

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología Animal



**MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL
ENVEJECIMIENTO EN EL TRACTO GENITOURINARIO:
ANÁLISIS EN UN MODELO DE SENESCENCIA
PREMATURA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Aránzazu Lafuente Sanchís

Bajo la dirección de los doctores

Ángeles García Pascual
Domingo Triguero Robles

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**Modificaciones inducidas por el envejecimiento en el
tracto genitourinario: análisis en un modelo de
senescencia prematura**

TOMO I

Tesis doctoral
Aránzazu Lafuente Sanchis
Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**Modificaciones inducidas por el envejecimiento en el
tracto genitourinario: análisis en un modelo de
senescencia prematura**

TOMO I

Memoria presentada por Aránzazu Lafuente Sanchis
para optar al grado de Doctor

Directores de la Tesis: Dra. Ángeles García Pascual
y Dr. Domingo Triguero Robles

Madrid, 2012

VºBº Directores

Ángeles García Pascual

Domingo Triguero Robles

Trabajo financiado por: Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-15135-C02-01). Universidad Complutense de Madrid (UCM GR85/06); UCM- Comunidad de Madrid (CCG07-UCM/SAL-2150), UCM-Banco Santander Central Hispano (920307-GR58/08, GR35/10-A-920307) y Fundación Mutua Madrileña (FMN 2011). El desarrollo de la tesis ha sido posible gracias a la percepción de una beca FPU del MEC (AP2006-02480).



Quino

Podría decir que el volumen que ocupa esta tesis es buen reflejo de lo que han sido estos 4 años y medio para mí. De Madrid me llevo mucho, amistades, vivencias inolvidables y por supuesto mi primer trabajo como aprendiz de investigadora. Todo esto no hubiera sido posible sin Ángeles y Domingo, mis directores, quienes confiaron en mí y me dieron la oportunidad de empezar en esto de la ciencia, gracias a los dos, por enseñarme y guiarme, por toda la ayuda prestada y por todo el tiempo dedicado a esta tesis, el día que sea doctora será sobretodo gracias a vosotros. Me siento muy afortunada de haber formado parte de este grupo, muchísimas gracias por todo. Así que, si queréis, una buena paella valenciana os espera como agradecimiento...

Gonzalo, si me he sentido en este laboratorio como en casa durante todo este tiempo es en gran parte gracias a ti, has estado incondicionalmente siempre para ayudarme en todo, preocupándote a cada momento por mis experimentos, por mi estado de ánimo, hasta por mi salud (si no estoy ciega a estas alturas creo que es por la veces que me has encendido la luz y me has subido la persiana...), pero además me has hecho reír infinitas veces, sin ánimo de ser pelota pero en todos los departamentos del mundo debería haber alguien como tú, la *Beckham* te va a echar mucho de menos, muchísimas gracias por todo.

María, una tesis entera de agradecimientos sólo para ti se quedaría corta, como no quiero tener que hacer tres tomos voy a intentar resumir. Ya sabes que la mejor impresión que me llevé de Madrid aquellos primeros días fuiste tú. Y esa primera impresión se confirmó con el tiempo. Has sido la compañera de laboratorio perfecta, esa que no sólo te ayuda cuando lo necesitas sino con la que conectas de verdad, con la que te encanta ir a trabajar todos los días, con la que te ríes y con la que acabas cantando a pulmón abierto pimpinela mientras montas sin darte cuenta de que en el laboratorio de al lado a lo mejor os están escuchando...no podía haber pedido una mejor compañera que tú. Pero además has sido mi compañera de piso durante 4 años, y si has sido buena compañera de laboratorio de piso aún más, te has convertido en una de mis mejores amigas, y tu amistad es lo mejor que me llevo de aquí. Estos 4 años no hubieran sido los mismos sin ti, así como tampoco esta tesis pues has sido como una tercera directora encubierta... como dirían en mi tierra: eres or xata! Infinitas gracias por todo.

Jose, muchas gracias también por todo, estuvo bien tener a alguien más en el laboratorio durante una temporada, da gusto encontrarse con gente que crea buen ambiente y con la que puedes poner un poco de humor al día a día ¡gracias!

Laura, gracias a ti también. Me alegro de haber compartido contigo aquellas prácticas de manejo, gracias por el apoyo moral de esas semanas. Espero que tengas mucha suerte.

En general tengo que dar gracias a todo el departamento de Fisiología Animal, en especial a Pedro, por haberme socorrido aquel día con el problema de la tutela, ya me

visualitzava fent les maletes abans de hora... Y a Mar, per les classes particulars sobre maneig, al final ho aconseguim i sense mordiscos, tot un èxit...gràcies. També a Rosa, Alicia, Rosana, Bene, Luis, Gema i a tots els demés, gràcies per la amabilitat mostrada durant tots aquests anys. Així com a Marta per la seva companyia i per la assistència tècnica durant els primers anys de tesi.

Me agradaria també agrair a la Dra. Magdalena Torres i al Dr. José Sánchez-Prieto la ajuda prestada perquè aquesta tesi pogués acabar com devia, moltíssimes gràcies. Així com al Dr. J.A.F. Tresguerres que em cedís les parelles reproductores SAM-R1 i SAM-P8 amb les que he pogut desenvolupar aquest estudi.

També a Alfonso i Luis, del servei de microscòpia de la ucm, gràcies per la assistència tècnica tants i tants dies de microscòpia.

Soriana, encara que mai t'entendí molt bé, sé que les teves intencions eren bones, així que moltes gràcies també a tu.

A pesar de que no hi havia manera de punxar l'uretra, el temps que vaig passar a Barcelona també va ser genial... Moltíssimes gràcies, Marcel, Diana i Víctor, gràcies per fer-me sentir com una més del grup i per tot el temps que em vaig dedicar, va ser un plaer estar allí i aprendre la tècnica amb vosaltres.

I com no, gràcies a la meua família...

Mamà, moltíssimes gràcies per tot, gràcies per estar allí sempre, per creure en mi quan jo no ho feia, i per ser un exemple a seguir, mai m'has flaquejat a pesar de les dificultats, valdries com investigadora espanyola... Si acabe sent doctora també és per tu, sí, perquè si no m'haguessis inculcat des de l'escola que havia de traure la màxima nota possible en tots els exàmens (quants plors per traure 7s...) no crec que haguera aconseguit suficient nota mitjana en la carrera per a la beca. Mil gràcies per tot, no exageres quan dic que eres increïble!

Pablo, he de agrair-te molt a tu també, entre altres mil coses que sempre has estat allí per resoldre els meus dubtes des de xicoteta, com on se n'anava aquell electró que sobrava després de la reacció nuclear...et sona? (encara no m'ha quedat molt clar...), gràcies per la paciència, per ensenyar-me tantes coses i per estar sempre allí!

Iaios! Gràcies, gràcies i gràcies!! Gràcies per ser com uns segons pares, i gràcies també a tota la resta de la família, Estefi, Adri, Lucía, tio Vicente i tia Patro...i a la que acaba d'aplegar, Noelia (si em descuide vens de propi poc a la presentació de la tesi...),

també als que ja no estan, tia Fina, encara recorde els teus consells quan em mudava a la capital... a tots, gràcies per fer-me la vida més agradable!

Tengo que dar las gracias también a todos mis amigos, que si no han participado activamente de esta tesis sí lo han hecho indirectamente insuflándome ánimos a cada momento y estando a mi lado, muchos de ellos incluso en la distancia. Gràcies a tots però en especial a les meues drogues dures: Amparo, Ana, Ceci, Núria, Pan i Vio (per ordre alfabètic...), i també a les meues xiquetes d'Almàssera (Ciru, Sandra, Sara i Sonia), gràcies a totes! Algunas de ellas merecerían mención especial por representarme a pie de calle divulgando a los cuatro vientos mis prácticas de laboratorio y el contenido de esta tesis...aunque a veces preferiría que lo omitieran...gràcies!

Gracias por supuesto también a mis otras compañeros de piso durante estos 4 años, Cace y Parrote, habéis ayudado a hacer que mi estancia en Madrid sea perfecta con una convivencia en casa inmejorable ¡muchas gracias!

Por último no me quiero olvidar de Al pacino, Rita, Elvis, Gertru, Goya, Consuelo, etc... todos esos ratones sin los que este estudio hubiera sido más que imposible, muchas gracias.

Moltes gràcies a tots!

Abreviaturas

ACh	acetilcolina
Akt	treonina proteinkinasa Akt
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosín trifosfato
AUC	área bajo la curva
AVP	Arginina-Vasopresina
CaM	calmodulina
CGRP	péptido relacionado con el gen de calcitonina
c-kit	receptor de tirosinquinasa
CNG	canales activados por nucleótidos cíclicos
CO	monóxido de carbono
COX	ciclooxigenasa
DAG	diacilglicerol
DEA/NO	dietilamine NONOate
dF/dt	velocidad de contracción o de relajación
EC₅₀	concentración eficaz 50
ED	disfunción eréctil
EFS	estimulación eléctrica transmural
EF₅₀ f	recuencia inhibitoria 50
EL	espacios lacunares
E_{max}	respuesta máxima
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
ET	endotelina
EUE	esfínter uretral externo
EUI	esfínter uretral interno
F₀	tensión o fuerza
GC	guanilato ciclasa
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
GTP	guanosín trifosfato (9-β-D-ribofuranosilguanina-5'-trifosfato)
H&E	hematoxilina-eosina
HO-1	hemooxigenasa 1
HO-2	hemooxigenasa 2
IBMX	isobutil-metil-xantina
ICC-IM	células intersticiales de Cajal intramusculares
ICC-LP	células intersticiales de Cajal de la lámina propia
ICCs	células intersticiales de Cajal
ICC-SEP	células intersticiales de Cajal septales
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IP₃	inositol trifosfato

L-NOARG	N ^G -nitro-L-arginina
LUTS	síntomas del tracto urinario inferior
L₀	longitud óptima
NA	noradrenalina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
NPY	neuropéptido Y
NSD	suero normal de asno
ODQ	1H-⟨1,2,4⟩ oxadiazolo ⟨4,3⟩ alquinoxalin-1-one
O₂⁻	anión superóxido
PB	buffer fosfato
PDE	fosfodiesterasa
pEC₅₀	- logaritmo de EC ₅₀
PG	prostaglandina
PKA	proteinkinasa A
PKG I	proteína kinasa dependiente de GMPc de tipo I
PLC	fosfolipasa C
RhoA	homólogo ras de la familia A
ROCK	rho-kinasa
ROS	especies reactivas de oxígeno
RT	temperatura ambiente
SAM-P8	Senescent Accelerated Mouse Prone 8
SAM-R1	Senescent Accelerated Mouse Resistant 1
SP	sustancia P
TRP	receptor de potencial transitorio
TSH	tirosina hidroxilasa
TTX	tetrodotoxina
TX-100	Triton X-100
VACht	transportador vesicular de acetilcolina
VIP	polipéptido intestinal vasoactivo
5-HT	serotonina (5-hidroxitriptamina)

ÍNDICE TOMO I

I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. FISIOLÓGÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR	13
1.1.1. Anatomía e histología de la vejiga y la uretra	13
1.1.2. Mantenimiento de la continencia urinaria y reflejo de micción	17
1.1.3. Control de la funcionalidad vesical y uretral	19
1.1.3.1. Regulación nerviosa	19
- <i>Neurotransmisión colinérgica</i>	19
- <i>Neurotransmisión adrenérgica</i>	21
- <i>Neurotransmisión nitrérgica</i>	23
- <i>Neurotransmisión purinérgica</i>	26
- <i>Otros neurotransmisores</i>	27
1.1.3.2. Autacoides: prostaglandinas	29
1.1.3.3. Función del urotelio	30
1.1.3.4. Papel de las células intersticiales de Cajal	32
1.1.3.5. Diferencias de género en la función vesical y uretral	36
1.2. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN EL TRACTO URINARIO INFERIOR: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD	37
1.3. FISIOLÓGÍA DE LA ERECCIÓN PENEANA	43
1.3.1. Anatomía e histología del pene	43
1.3.2. Erección y detumescencia peneana	46
1.3.3. Regulación de la función eréctil	48
1.3.3.1. Regulación nerviosa	48
- <i>Neurotransmisión colinérgica</i>	48
- <i>Neurotransmisión adrenérgica</i>	48
- <i>Neurotransmisión nitrérgica</i>	49
- <i>Otros neurotransmisores</i>	50
1.3.3.2. Papel del endotelio	51
1.3.3.3. Las células intersticiales de Cajal en el cuerpo cavernoso	53
1.4. DISFUNCIÓN ERÉCTIL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD	54
II. OBJETIVOS	57
III. MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1. MATERIAL	63

3.1.1. Material biológico	63
3.1.2. Material de laboratorio	63
3.1.2.1. Soluciones	63
3.1.2.2. Sustancias, reactivos y otros productos	64
3.1.2.3. Programas informáticos	65
3.2. MÉTODOS	65
3.2.1. Estudios de frecuencia miccional	65
3.2.2. Estudios funcionales <i>in vitro</i>	65
3.2.2.1. Disección y preparación del tejido	65
3.2.2.2. Registro de la actividad contráctil	66
3.2.2.3. Determinación de la tensión óptima (L_0)	67
3.2.2.4. Estimulación eléctrica transmural (EFS)	68
3.2.2.5. Protocolo experimental	69
3.2.3 Estudios morfológicos	70
3.2.3.1. Obtención y tratamiento de las muestras	70
3.2.3.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina	72
3.2.3.3. Inmunohistofluorescencia	72
3.2.4. Inmunolocalización de la producción de cGMP	75
3.2.5. Análisis de datos	75
3.2.5.1. Respuestas contráctiles y relajantes	75
3.2.5.2. Cuantificación de la reacción de inmunohistofluorescencia	76
3.2.5.3. Estudio estadístico	76
IV. RESULTADOS	77
4.1. DIFERENCIAS EN EL ESTADO DE SALUD GENERAL Y UROLÓGICA ENTRE RATONES SAM-R1 Y SAM-P8	79
4.1.1. Cambios en el aspecto externo de los animales	79
4.1.2. Variaciones en el peso corporal y de los órganos genitourinarios	79
4.1.3. Cambios en el patrón miccional	80
4.2. VEJIGA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1	80
4.2.1. Cambios estructurales	80
4.2.2. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por una alta concentración de K^+ extracelular	81

4.2.3. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por EFS	81
4.2.3.1. Hembras	81
a) Respuesta contráctil inducida por EFS en la vejiga de ratones hembra	81
b) Mediadores implicados	82
4.2.3.2. Machos	84
a) Respuesta contráctil inducida por EFS	84
b) Mediadores implicados	84
4.2.4. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por ACh y ATP exógeno	86
4.2.5. Cambios en la densidad de innervación vesical	87
4.2.5.1. Innervación colinérgica	87
4.2.5.2. Innervación nitrérgica	88
4.2.5.3. Innervación adrenérgica	89
4.2.6. Cambios en la densidad de ICCs vesicales positivas a vimentina	90
<i>4.2.7. Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la vejiga de ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1</i>	91
4.2.8. Estudios de colocalización en la vejiga	92
4.2.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales	92
a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)	92
b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)	92
4.2.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs	93
a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)	93
b) Noradrenalina (TSH)-ICCs (Vimentina)	94
4.3. URETRA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 hembras en comparación con SAM-R1	95
4.3.1. Cambios estructurales	95
4.3.2. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por una alta concentración de K⁺ extracelular	96
4.3.3. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por EFS y por agonistas exógenos	96
4.3.3.1. Contracción	96
4.3.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS	96
a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8	96
b) Mediadores implicados	97
4.3.3.1.2. Respuesta contráctil inducida por NA	97

4.3.3.2. Relajación	97
4.3.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS	98
a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8	98
b) Mediadores implicados	98
4.3.3.2.2. Relajación inducida por DEA/NO	98
4.3.3.2.3. Relajación inducida por Sildenafil	99
4.3.3.2.4 Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast	99
a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8	99
b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)	100
4.3.4. Cambios en la densidad de innervación uretral	101
4.3.4.1. Innervación colinérgica	101
4.3.4.2. Innervación nitrérgica	102
4.3.4.3. Innervación adrenérgica	103
4.3.5. Cambios en la densidad de ICCs uretrales	103
4.3.5.1. Densidad de ICCs positivas a vimentina	103
4.3.6. Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la uretra de ratones hembra SAM-P8 en comparación con SAM-R1	104
4.3.7. Cambios en la inmunorreactividad a cGMP	104
4.3.7.1. cGMP inducido por la adición exógena de DEA/NO	104
4.3.7.2. Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa con ODQ	105
4.3.7.3. Inmunorreactividad control en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas	105
4.3.8. Estudios de colocalización en la uretra	106
4.3.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales	106
a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)	106
b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)	106
4.3.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs	107
a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)	107
b) Noradrenalina (TSH)- ICCs (Vimentina)	107
4.3.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP	107
4.4. CUERPO CAVERNOSO: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1	109
4.4.1. Cambios estructurales	109

4.4.2. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por una alta concentración de K⁺ extracelular	109
4.4.3. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por EFS y por agonistas exógenos	110
4.4.3.1. Contracción	110
4.4.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS	110
a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8	110
b) Mediadores implicados	110
4.4.3.1.2. Respuesta contráctil inducida por NA	110
4.4.3.2. Relajación	111
4.4.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS	111
a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8	111
b) Mediadores implicados	111
4.4.3.2.2. Respuesta relajante inducida por DEA/NO	111
4.4.3.2.3. Respuesta relajante inducida por Sildenafil	112
4.4.3.2.4. Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast	112
a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8	112
b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)	113
4.4.4. Diferencias en la funcionalidad endotelial del cuerpo cavernoso	114
4.4.4.1. Respuesta relajante/contráctil inducida por ACh	114
4.4.4.2. Mediadores implicados	115
a) Respuesta relajante	116
b) Respuesta contráctil	118
4.4.5. Cambios en la densidad de innervación en el cuerpo cavernoso	120
4.4.5.1. Innervación colinérgica	120
4.4.5.2. Innervación nitrérgica	120
4.4.5.3. Innervación adrenérgica	121
4.4.6. Cambios en la inmunorreactividad a eNOS en el cuerpo cavernoso	121
4.4.7. Cambios en la densidad de ICCs del cuerpo cavernoso	122
4.4.7.1. Densidad de ICCs positivas a vimentina	122
4.4.7.2. Inmunorreactividad a cGMP	122
4.4.7.2.1. Inmunorreactividad a cGMP inducida por DEA/NO o por EFS	122
4.4.7.2.2. Efecto de la inhibición de la GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)	123
4.4.8. Estudios de colocalización en el cuerpo cavernoso	124

4.4.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores	124
a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)	124
b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)	124
4.4.8.2. Relación entre ICCs positivas a vimentina y nervios intramurales	124
a) Vimentina-Acetilcolina (VACHT)	124
b) Vimentina- Noradrenalina (TSH)	125
4.4.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP	125
V. DISCUSIÓN	127
5.1. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN LA CAPA MUSCULAR DE LA VEJIGA	130
5.1.1. Efectos sobre las respuestas neurogénicas en la hembra	133
5.1.2. Efectos sobre las respuestas neurogénicas en el macho	140
5.2. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN LA CAPA MUSCULAR DE LA URETRA	144
5.3. CAMBIOS INDUCIDOS POR EL ENVEJECIMIENTO EN LA LÁMINA PROPIA VESICAL Y URETRAL	153
5.4. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN EL CUERPO CAVERNOSO DEL PENE	158
5.4.1. Respuestas neurogénicas	158
5.4.2. Funcionalidad endotelial	162
VI. CONCLUSIONES	171
VII. BIBLIOGRAFÍA	175

ÍNDICE TOMO II

IV. RESULTADOS (TABLAS Y FIGURAS)	1
4.1. DIFERENCIAS EN EL ESTADO DE SALUD GENERAL Y UROLÓGICA ENTRE RATONES SAM-R1 Y SAM-P8	3
4.1.1. Cambios en el aspecto externo de los animales	3
4.1.2. Variaciones en el peso corporal y de los órganos genitourinarios	3
4.1.3. Cambios en el patrón miccional	4
4.2. VEJIGA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1	7
4.2.1. Cambios estructurales	7
4.2.2. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por una alta concentración de K ⁺ extracelular	8
4.2.3. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por EFS	9
4.2.3.1. Hembras	9
a) Respuesta contráctil inducida por EFS en la vejiga de ratones hembra	9
b) Mediadores implicados	10
4.2.3.2. Machos	13
a) Respuesta contráctil inducida por EFS en la vejiga de ratones macho	13
b) Mediadores implicados	14
4.2.4. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por ACh y ATP exógeno	17
4.2.5. Cambios en la densidad de innervación vesical	21
4.2.5.1. Innervación colinérgica	21
4.2.5.2. Innervación nitrérgica	29
4.2.5.3. Innervación adrenérgica	37
4.2.6. Cambios en la densidad de ICCs vesicales positivas a vimentina	45
4.2.7. <i>Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la vejiga de ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1</i>	53
4.2.8. Estudios de colocalización en la vejiga	54
4.2.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales	54
a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)	54
b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)	56
4.2.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs	59
a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)	59

b) Noradrenalina (TSH)-ICCs (Vimentina)	62
4.3. URETRA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 hembras en comparación con SAM-R1	65
4.3.1. Cambios estructurales	65
4.3.2. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por una alta concentración de K⁺ extracelular	65
4.3.3. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por EFS y por agonistas exógenos	66
4.3.3.1. Contracción	66
4.3.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS	66
a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8	66
b) Mediadores implicados	67
4.3.3.1.2. Respuesta contráctil inducida por NA	68
4.3.3.2. Relajación	69
4.3.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS	69
a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8	69
b) Mediadores implicados	70
4.3.3.2.2. Relajación inducida por DEA/NO	72
4.3.3.2.3. Relajación inducida por Sildenafil	74
4.3.3.2.4 Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast	76
a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8	76
b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)	78
4.3.4. Cambios en la densidad de innervación uretral	80
4.3.4.1. Innervación colinérgica	80
4.3.4.2. Innervación nitrérgica	85
4.3.4.3. Innervación adrenérgica	90
4.3.5. Cambios en la densidad de ICCs uretrales	95
4.3.5.1. Densidad de ICCs positivas a vimentina	95
4.3.6. Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la uretra de ratones hembra SAM-P8 en comparación con SAM-R1	100
4.3.7. Cambios en la inmunorreactividad a cGMP	101
4.3.7.1. cGMP inducido por la adición exógena de DEA/NO	101
4.3.7.2. Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa con ODQ	106

4.3.7.3. Inmunorreactividad control en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas	109
4.3.8. Estudios de colocalización en la uretra	112
4.3.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales	112
a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)	112
b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)	113
4.3.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs	116
a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)	116
b) Noradrenalina (TSH)- ICCs (Vimentina)	117
4.3.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP	118
4.4. CUERPO CAVERNOSO: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1	129
4.4.1. Cambios estructurales	129
4.4.2. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por una alta concentración de K ⁺ extracelular	130
4.4.3. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por EFS y por agonistas exógenos	131
4.4.3.1. Contracción	131
4.4.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS	131
a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8	131
b) Mediadores implicados	132
4.4.3.1.2. Respuesta contráctil inducida por NA	133
4.4.3.2. Relajación	134
4.4.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS	134
a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8	134
b) Mediadores implicados	135
4.4.3.2.2. Respuesta relajante inducida por DEA/NO	136
4.4.3.2.3. Respuesta relajante inducida por Sildenafil	138
4.4.3.2.4. Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast	140
a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8	140
b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)	142
4.4.4. Diferencias en la funcionalidad endotelial del cuerpo cavernoso	144
4.4.4.1. Respuesta relajante/contráctil inducida por ACh	144
4.4.4.2. Mediadores implicados	146
a) Respuesta relajante	148

b) Respuesta contráctil	150
4.4.5. Cambios en la densidad de innervación en el cuerpo cavernoso	152
4.4.5.1. Innervación colinérgica	152
4.4.5.2. Innervación nitrérgica	154
4.4.5.3. Innervación adrenérgica	156
4.4.6. Cambios en la inmunorreactividad a eNOS en el cuerpo cavernoso	158
4.4.7. Cambios en la densidad de ICCs del cuerpo cavernoso	159
4.4.7.1. Densidad de ICCs positivas a vimentina	159
4.4.7.2. Inmunorreactividad a cGMP	161
4.4.7.2.1. Inmunorreactividad a cGMP inducida por DEA/NO o por EFS	161
4.4.7.2.2. Efecto de la inhibición de la GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)	163
4.4.8. Estudios de colocalización en el cuerpo cavernoso	166
4.4.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores	166
a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)	166
b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)	167
4.4.8.2. Relación entre ICCs positivas a vimentina y nervios intramurales	168
a) Vimentina-Acetilcolina (VACHT)	168
b) Vimentina- Noradrenalina (TSH)	169
4.4.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP	170

I. INTRODUCCIÓN

1.1. FISIOLÓGÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR

Las funciones del tracto urinario inferior son el almacenamiento (continencia) y la eliminación periódica (micción) de la orina. Estos procesos dependen de la actividad coordinada de la vejiga urinaria, donde es almacenada la orina, y del conjunto formado por el esfínter uretral interno, la uretra y el esfínter uretral externo de músculo estriado que conforman la estructura tubular por la que es expulsada la orina en el proceso de micción. Dicha coordinación implica un complejo sistema de control neural tanto central (cerebro y médula espinal) como periférico, y que regula tanto su actividad autónoma como somática (Lincoln y Burnstock, 1993).

1.1.1. Anatomía e histología de la vejiga y la uretra

La vejiga urinaria es un órgano muscular hueco con forma de saco situado en el suelo de la fosa pélvica y que se compone de:

1- El *cuerpo vesical*: ocupa la mayor parte de la vejiga y tiene la función de almacenar la orina.

2- El *trígono*: es una zona triangular localizada en la pared posteroinferior de la vejiga por cuyos ángulos superiores penetran, oblicuamente, los uréteres.

3- El *cuello de la vejiga*: conecta con la uretra y está compuesto por músculo liso involuntario.

El esfínter uretral interno (EUI) formado por la parte muscular lisa de la uretra conforma un tubo muscular que finaliza en el esfínter uretral externo (EUE), o rabdoesfínter, compuesto por músculo estriado y bajo control voluntario somático (Brading, 1999).

La uretra femenina únicamente conduce orina, es más corta y sencilla que la masculina y con estructura más uniforme (Brading, 1999). La uretra masculina se extiende desde el cuello vesical hasta un orificio externo en el extremo libre del pene, constituyendo la vía de salida al exterior tanto del aparato excretor como del reproductor. En ella se distinguen tres regiones: uretra *prostática* que discurre a través de la glándula prostática abriéndose a ella las glándulas periureterales y los conductos eyaculadores; uretra *membranosa* que discurre a través de los músculos de la pelvis y es la zona del control voluntario de la micción, y uretra *esponjosa o peneana* que está incorporada en el pene y se considera un componente de este órgano (Stevens y Lowe, 1998; Sisson, 1973).

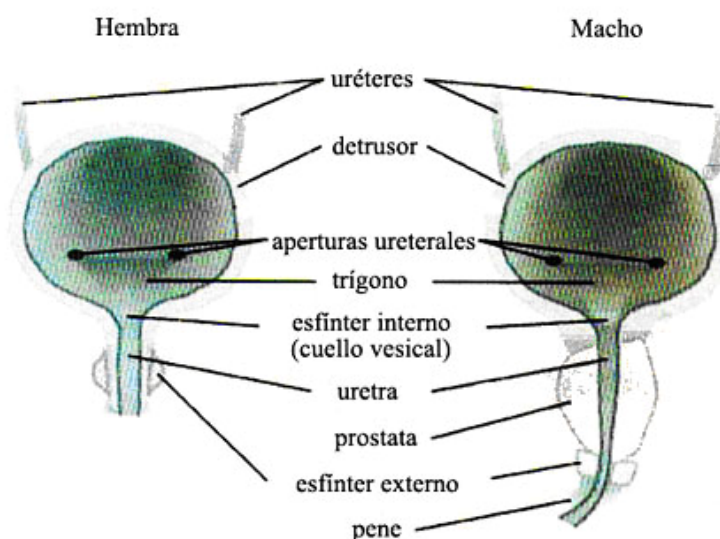


Figura I. Anatomía de la vejiga y la uretra urinaria (Fry *et al.*, 2010).

El **urotelio o mucosa** que tapiza el interior de la vejiga es un epitelio de transición que se compone de al menos 3 capas, la más superficial de las cuales está formada por grandes células hexagonales denominadas “células en paraguas”, ya que son capaces de aumentar su superficie durante el llenado de la vejiga (Birder, 2006). Bajo el urotelio se extiende la **lámina propia o submucosa**, compuesta por tejido conectivo laxo con numerosos vasos sanguíneos, nervios y algunas células de músculo liso. Seguidamente aparece la capa muscular lisa vesical o **detrusor**, cuyas células musculares lisas se disponen en haces organizados en disposición longitudinal (capas interna y externa) y circular (capa intermedia; Christ y Hodges, 2006). Los miocitos del detrusor están conectados mediante uniones intercelulares comunicantes “gap junctions”, formando un sincitio funcional cuya contracción coordinada es determinante durante la micción (Andersson y Arner, 2004; Silva y Karram, 2004). Por último la vejiga está recubierta por una capa de tejido conectivo laxo retroperitoneal denominada **serosa o adventicia** (Gabella, 1997).

Nuestro estudio se ha realizado en uretra de ratones hembra, por lo que la descripción histológica se limitará a la uretra femenina, que presenta las mismas capas previamente descritas en la vejiga. El **urotelio**, de transición en la zona proximal, va cambiando gradualmente a epitelio cilíndrico pseudoestratificado hasta convertirse en escamoso estratificado cerca del orificio externo. Además a lo largo de toda la capa encontramos las glándulas de Littre, que secretan mucus para proteger a la uretra de los efectos corrosivos de la orina (Gartner y Hiatt, 2002). La **lámina propia o submucosa** es una capa de tejido conjuntivo muy vascularizada y cuyas fibras elásticas están asociadas

a las musculares aportando resistencia a la estructura (Augsburger *et al.*, 1993). La presencia de algunos espacios cavernosos le proporciona características de tejido eréctil. La **túnica muscular** de la uretra está constituida por tres capas: interna (músculo liso longitudinal), media (músculo liso circular) y externa (músculo estriado). En ésta, las fibras estriadas presentan una disposición múltiple y su grosor aumenta gradualmente hasta el extremo distal formando parte del EUE. Se ha demostrado la existencia de una gran cantidad de uniones intercelulares de tipo adherente entre las células musculares lisas, así como de uniones intercelulares comunicantes que permiten el acoplamiento eléctrico. Finalmente se encuentra la **serosa o adventicia** formada por tejido conjuntivo laxo y adiposo.

Inervación eferente

La contracción del detrusor y la relajación del EUI y de la uretra dependen de la activación de neuronas parasimpáticas localizadas en la columna intermediolateral del segmento medular sacro (S2-S4), cuyas fibras forman los nervios sacros y posteriormente los nervios pélvicos. Éstos terminan en pequeños ganglios situados en la superficie o en el interior de la pared vesical ampliamente interconectados (ganglios intramurales). Su número y distribución varía según la especie y el sexo, en el caso de los humanos se ha determinado que la mujer presenta menor cantidad de ganglios que el hombre a nivel ureterovesical y vesicouretral (Dixon *et al.*, 1983). La transmisión nerviosa en los ganglios vesicales está mediada por receptores colinérgicos nicotínicos, pudiendo ser a su vez modulada por la activación de varios tipos de receptores incluidos muscarínicos, adrenérgicos, purinérgicos y peptidérgicos (de Groat y Booth, 1993). Las fibras postganglionares por su parte liberan acetilcolina (ACh) que actúa en receptores muscarínicos presentes en el músculo detrusor (M_2 y M_3), o en las mismas terminaciones nerviosas postganglionares inhibiendo (M_2) o facilitando (M_1) su propia liberación. Junto con la ACh se ha demostrado la liberación de adenosín trifosfato (ATP) desde estas terminaciones nerviosas, aunque en el caso de los humanos el componente purinérgico parece ser pequeño (Yoshimura, 1999). El nervio pélvico también transporta fibras parasimpáticas a la uretra y al EUI liberando óxido nítrico (NO) entre otros mediadores (Andersson y Wein, 2004).

La inervación simpática de la vejiga y la uretra se origina principalmente en el núcleo intermediolateral de la región toracolumbar (T10-L2) de la médula espinal. Los axones viajan a través del ganglio inferior mesentérico y del nervio hipogástrico o pasan a través de la cadena paravertebral y se introducen en el nervio pélvico (Andersson y Wein, 2004). La transmisión ganglionar en las vías simpáticas también está mediada por ACh actuando en receptores nicotínicos. Los terminales postganglionares simpáticos por su parte liberan principalmente noradrenalina (NA) que actuará sobre los receptores adrenérgicos localizados en la vejiga y la uretra.

La innervación somática por su parte se distribuye en el EUE regulando su contractilidad a través del nervio pudendo interno que se origina en las astas anteriores de los segmentos sacros 2º, 3º y 4º de la médula espinal. Las terminaciones nerviosas somáticas liberan ACh que actúa sobre receptores nicotínicos de las fibras musculares estriadas induciendo su contracción (Yoshimura, 1999).

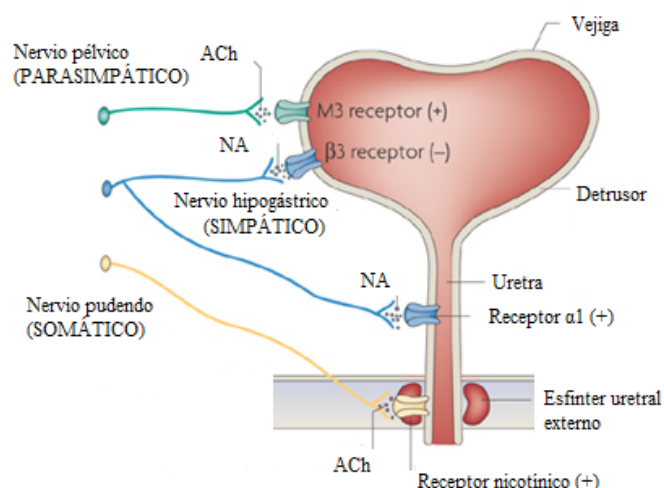


Figura II. Vías nerviosas que participan en la contracción (+) o relajación (-) de los elementos musculares que participan en el proceso de micción. (Fowler *et al.*, 2008).

Inervación aferente

La mayoría de la información sensorial de la vejiga, provocada tanto por el llenado normal como por estímulos dolorosos es conducida a la médula espinal a través de terminaciones aferentes de los nervios pélvicos e hipogástricos. Adicionalmente las sensaciones térmicas y de micción inminente de la uretra se transmiten por nervios aferentes de la vía pélvica y pudenda (Andersson y Arner, 2004).

En la vejiga y la uretra los nervios aferentes se han localizado tanto suburotelialmente como en la capa muscular. Las terminaciones que se localizan en el suburotelio se distribuyen de forma uniforme por la uretra mientras que en la vejiga forman un plexo nervioso que aunque es escaso en la zona de la cúpula va aumentando gradualmente su densidad al acercarse al cuello vesical, siendo particularmente denso en el trigono (Andersson, 2002). La innervación aferente del músculo es difusa y se distribuye de forma uniforme (Gabella y Davis, 1998).

En el proceso de micción los nervios aferentes más importantes son fibras A δ mielínicas y fibras C no mielínicas. Las fibras A δ mielínicas responden a la distensión pasiva de la pared de la vejiga, transmitiendo información acerca del llenado vesical (Janig y Morrison, 1986). En este proceso el glutamato participa como neurotransmisor principal en las sinapsis medulares (Yoshimura *et al.*, 2008) y además se ha sugerido la participación del ATP (Smith *et al.*, 2002). El umbral de activación de las fibras A δ mielínicas es de 5 a 15 mm H₂O, que es la presión intravesical a la que el ser humano percibe la primera sensación de llenado vesical (de Groat, 2006). Las fibras C no mielínicas por otra parte tienen un umbral mecánico muy alto y principalmente responden a la irritación química de la mucosa vesical (Habler *et al.*, 1990) o al frío (Fall *et al.*, 1990), empleando como neurotransmisores habituales el glutamato, la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) (Yoshimura *et al.*, 2008). Estas fibras además son sensibles a neurotoxinas y a sustancias liberadas por las células uroteliales e inflamatorias, así como por los propios nervios aferentes: taquíninas, NO, ATP, prostaglandinas (PGs), endotelinas y factores neurotróficos (Maggi, 1993; Chuang *et al.*, 2001; Rong *et al.*, 2002; Morrison *et al.*, 2005), de manera que estas sustancias son capaces de modular la respuesta de las vías aferentes a la estimulación mecánica.

Las fibras aferentes además presentan receptores vanilloides TRPV1 que actúan como canales iónicos y proporcionan a las fibras sensibilidad a capsaicina, al calor, a protones y a metabolitos lipídicos como anandamina. La activación de estos receptores incrementa el estímulo doloroso y la actividad refleja del órgano participando en la función normal de vaciado vesical (Birder, 2010).

1.1.2. Mantenimiento de la continencia urinaria y reflejo de micción

El ciclo de micción se compone de dos fases: la fase de **continencia** en la que la vejiga mantiene un estado de relajación adaptativa permitiendo el llenado de la orina a la vez que la uretra genera una presión intraluminal superior a la vesical para impedir la salida de la orina al exterior, y la fase de **vaciado** en la que se necesita de la contracción del detrusor, la apertura de la uretra y el cierre de la unión ureterovesical hasta finalizar la evacuación de la orina (Brading, 1999).

Durante la fase de **continencia** la presión vesical permanece baja y constante debido al efecto combinado de dos fenómenos, uno pasivo que depende de las propiedades viscoelásticas de la pared de la vejiga, y otro neurogénico debido a la quiescencia de la actividad parasimpática de la vejiga (de Groat, 1993; Yoshimura y de Groat, 1997). Además durante el llenado vesical, las fibras aferentes activan una vía refleja en la médula espinal que manda señales simpáticas a la vejiga que inhiben la actividad vesical y la contracción del cuello vesical y de la uretra (de Groat y Theobald, 1976). La

liberación de NA de las vías simpáticas por una parte estimula los receptores β -adrenérgicos del detrusor mediando la relajación muscular de la vejiga, y por otra activa los receptores α_1 -adrenérgicos del cuello vesical y la uretra mediando la contracción de estas zonas para impedir la salida de la orina. Además, las motoneuronas pudendas también son activadas por la actividad aferente vesical y uretral induciendo la contracción del músculo estriado del EUE (Shimoda *et al.*, 1992; Fedirchuk y Shefchyk, 1993).

Aunque la iniciación de la micción es un acto voluntario, posteriormente el proceso continúa de forma automática gracias al reflejo de micción. Cuando el volumen de la vejiga alcanza el umbral los mecanorreceptores de la pared vesical inician una señal aferente que pone en marcha el reflejo de micción o la fase de **vaciamiento**. Las señales de las fibras nerviosas aferentes se transmiten a partir de los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal a la sustancia gris periacueductal para finalmente estimular el núcleo pontino de la micción (Kavia *et al.*, 2005). Estos estímulos activan la vía eferente parasimpática y la inhibición de la vía simpática y somática llevando a la contracción de la vejiga y la relajación simultánea de los esfínteres interno y externo (de Groat, 1998). Además el reflejo de micción es facilitado por fibras aferentes uretrales que aumentan la contracción vesical al ser activadas por el paso de la orina (Chai y Steers, 1996).

Aunque el reflejo de micción es completamente autónomo a nivel medular, varios centros nerviosos situados en el tronco del encéfalo o en la corteza cerebral pueden facilitar o inhibir este reflejo. En el caso de la micción voluntaria se contraen voluntariamente los músculos abdominales, provocando un aumento en la presión de la vejiga que estimula los receptores de distensión y excita aún más el reflejo de micción.

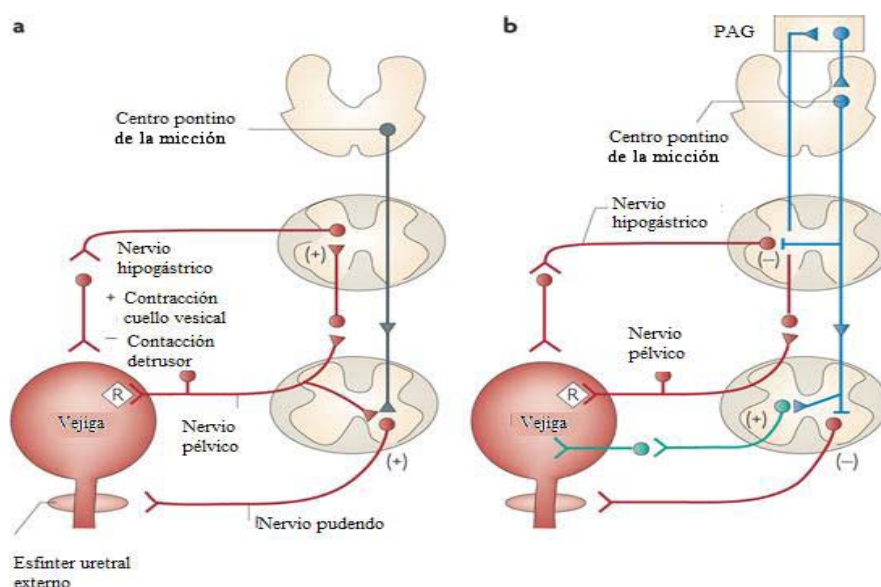


Figura III. (a) Reflejo de almacenamiento de la orina; (b) Reflejo de micción. Estimulación parasimpática del detrusor y del músculo liso uretral en color verde, e inhibición de las vías simpática y pudenda de la base de la vejiga y uretra en color rojo. PAG: sustancia gris periacueductal. R: receptores de la pared vesical de terminaciones nerviosas aferentes (Fowler *et al.*, 2008).

1.1.3. Control de la funcionalidad vesical y uretral

1.1.3.1. Regulación nerviosa

- Neurotransmisión colinérgica

Se ha demostrado la existencia de una densa red de nervios colinérgicos distribuidos a lo largo de todo el tracto urinario inferior tanto en humanos como en otras especies animales (Giglio y Tobin, 2009; Canda *et al.*, 2008). En la vejiga las terminaciones nerviosas colinérgicas y pequeñas neuronas inmunorreactivas al transportador vesicular de ACh (VACHT) se distribuyen muy próximas a los haces de fibras musculares y se localizan suburotelialmente (Andersson y Wein, 2004). En el músculo detrusor las contracciones nerviosas son parcialmente bloqueadas por atropina, antagonista de los receptores colinérgicos, en la mayoría de los animales excepto en humanos y primates donde son completamente abolidas por el bloqueante colinérgico (Fry *et al.*, 2010). En el detrusor se expresan los receptores muscarínicos M_2 y M_3 . Sin embargo, aunque la expresión de M_2 es muy superior, el subtipo más importante para la contracción vesical es M_3 (Andersson y Wein, 2004). Los receptores M_3 están acoplados a proteínas $G_{q/11}$ que activan la enzima fosfolipasa C (PLC) que a su vez genera inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) procedente de la hidrólisis de fosfatidilinositoles de la membrana celular. El IP_3 generado se une a receptores específicos presentes en los depósitos de Ca^{2+} intracelular mediando la liberación de Ca^{2+} para la contracción. Además, el

aumento de Ca^{2+} en las inmediaciones del retículo sarcoplásmico incrementa aún más su liberación a través del mecanismo conocido como "liberación de calcio inducido por calcio" en el que participan canales de calcio sensibles a ryanodina (Fry *et al.*, 2010). Existen muchas evidencias experimentales que apoyan la importancia de esta vía en la contracción vesical (Harriss *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2002; Braverman *et al.*, 2006). El DAG adicionalmente podría intervenir en este proceso activando la proteinkinasa C que fosforila a su vez a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina reduciendo su actividad e incrementando la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas musculares.

Sin embargo, la exclusividad de esta vía se ha discutido recientemente ya que inhibidores de PLC no son capaces en ocasiones de atenuar las contracciones mediadas por agonistas muscarínicos (Fry *et al.*, 2010). Alternativamente, se ha propuesto la participación de un mecanismo de aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas musculares a través de la activación de la vía *rho*-kinasa dependiente de RhoA (RhoA/ROCK). En este caso el aumento de Ca^{2+} intracelular se atribuye a la activación de canales catiónicos no específicos de la membrana celular que a su vez despolarizan la célula abriendo canales de Ca^{2+} tipo L (Frazier *et al.*, 2007, 2008). Actualmente no existe un consenso en cuanto a la importancia de la vía PLC en la contracción vesical debido posiblemente a considerables diferencias interespecíficas (Wuest *et al.*, 2007).

En lo que respecta a los receptores M_2 , su papel funcional no está muy claro y se ha sugerido que pueden facilitar las contracciones vesicales oponiéndose a la relajación muscular simpática (Hedge *et al.*, 1997). Estos receptores se acoplan a proteínas G_i inhibiendo la actividad adenilato ciclasa y reduciendo los niveles de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), lo que en última instancia produce una menor activación de la proteinkinasa A (PKA) y por tanto una menor inhibición de la contracción (Giglio y Tobin, 2009). Estos receptores además actúan inhibiendo canales de K^+ disminuyendo así la corriente de K^+ y por tanto la capacidad de hiperpolarización de la membrana, lo que incrementa la excitabilidad del detrusor (Bonev y Nelson, 1993; Kume *et al.*, 1995 a,b).

Los receptores muscarínicos también pueden localizarse en las terminaciones nerviosas presinápticas de la vejiga participando en la liberación del neurotransmisor. Estos receptores muscarínicos presinápticos pueden ser inhibitorios (M_2 en el conejo y la rata, y M_4 en el cobaya), o facilitadores (M_1 en la rata y el conejo) de la liberación (Andersson y Wein, 2004).

En la uretra la significación funcional de los nervios colinérgicos sigue siendo un asunto controvertido. Se han detectado receptores muscarínicos M_1 , M_2 y M_3 en diversas especies mediando la contracción uretral, si bien los subtipos que causan la contracción uretral humana no están bien establecidos (Canda *et al.*, 2008). No obstante sí se ha

determinado en la uretra humana y de otras especies que la contracción mediada por agonistas muscarínicos parece involucrar principalmente a la capa de músculo longitudinal, interpretándose que durante la micción la uretra acortaría su longitud favoreciendo el paso de la orina (Andersson y Wein, 2004). Otros investigadores, estudiando toda la longitud de la uretra de la mujer, han observado que la ACh contrae únicamente la parte proximal de la misma y el cuello de la vejiga (Taki *et al.*, 1999). Por otra parte se ha demostrado que la activación de los receptores muscarínicos localizados en las terminaciones nerviosas adrenérgicas y colinérgicas inhiben la liberación de NA y ACh disminuyendo el tono uretral y la presión intrauretral (Andersson y Wein, 2004).

En resumen, el papel fundamental de la innervación colinérgica en la uretra podría ser el de favorecer la eliminación de orina contrayendo la capa longitudinal muscular y inhibiendo, a través de mecanismos presinápticos, la liberación de NA y por tanto su acción contráctil. De esta forma se favorecería la eliminación de orina a través de la uretra en la fase de micción, en la cual predomina la actividad parasimpática colinérgica.

- Neurotransmisión adrenérgica

Las terminaciones adrenérgicas en el tracto urinario inferior no se distribuyen de forma uniforme, encontrándose una innervación dispersa en el cuerpo de la vejiga cuya densidad se ve incrementada notablemente en cuello vesical y uretra. También se han localizado terminales adrenérgicos en la lámina propia y vasos sanguíneos de ambas estructuras (Andersson y Wein, 2004).

En el detrusor humano esta innervación tiene una actividad relajante con un doble origen debido al efecto dual de la NA a nivel pre o postsináptico. Presinápticamente se ha sugerido que la NA estimula los receptores α_2 -adrenérgicos de los nervios colinérgicos disminuyendo la liberación de ACh. Postsinápticamente, la NA actúa sobre los receptores β -adrenérgicos, los cuales predominan sobre los α -adrenérgicos. La activación de los receptores β -adrenérgicos por la NA origina la estimulación de la adenilato ciclasa y el incremento consecuente en los niveles de cAMP que a su vez activa a la PKA (Andersson y Wein, 2004). Las vías de transducción activadas por la PKA que median la relajación vesical no están muy bien establecidas, habiendo sido propuesto por algunos investigadores la participación de los canales de potasio BK_{Ca} : activados por calcio de baja conductancia (Kobayashi *et al.*, 2000; Frazier *et al.*, 2008). En cuanto al subtipo de adrenoreceptor involucrado en la relajación del detrusor, el más importante parece ser el β_3 en la vejiga humana (Michel y Vrydag, 2006), aunque aún existe controversia a este respecto (Andersson y Wein, 2004).

Durante la fase de continencia el cierre del cuello vesical y de la uretra es dependiente de la actividad simpática, ya que el incremento de la presión uretral

inducido tanto por estimulación eléctrica de los nervios hipogástricos como por la administración de agonistas adrenérgicos es bloqueado por antagonistas de los receptores α -adrenérgicos. En los humanos se ha demostrado que la actividad de estos receptores es responsable de alrededor del 50% de la presión intrauretral (Appell *et al.*, 1980; Furuya *et al.*, 1982).

Aunque se ha establecido que en la uretra de la hembra existe un predominio de receptores α_2 -adrenérgicos sobre α_1 (Deplanne *et al.*, 1998), parece ser que son estos últimos, en concreto los subtipos α_{1L} y α_{1A} , los principales responsables de la contracción uretral adrenérgica durante la fase de llenado vesical (Andersson, 1993; Canda *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2000). En la uretra de la oveja se ha comprobado que tanto la estimulación eléctrica transmural (EFS) como la despolarización con altas concentraciones de K^+ , provocan la liberación de NA de las terminaciones adrenérgicas y la consiguiente activación de receptores postsinápticos α_1 , sugiriendo que este subtipo de receptor adrenérgico media casi por completo la respuesta postsináptica a NA (García-Pascual *et al.*, 1991a).

Los mecanismos moleculares por los que la NA contrae el tejido muscular uretral y del cuello de la vejiga no están claramente determinados. En el conejo se ha propuesto la participación de dos mecanismos mediados por diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , de forma que parece existir un subtipo α_{1B} que mediaría la contracción hidrolizando fosfatidilinositoles de la membrana y activando la liberación de Ca^{2+} intracelular a través de receptores sensibles a ryanodina, mientras que el subtipo α_{1A} controlaría la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de la membrana sensibles a dihidropiridinas originando la entrada de Ca^{2+} extracelular (Yoshida *et al.*, 1991). Más recientemente se ha postulado la implicación de la vía de la RhoA/ROCK incrementando la sensibilidad del músculo al Ca^{2+} y causando la contracción (Teixiera *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2011). RhoA es una pequeña GTPasa citosólica que tras su activación se transporta a la membrana plasmática donde activa a ROCK, que a su vez fosforila (e inhibe) a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, manteniéndose la unión actina-miosina durante más tiempo, y por lo tanto la contracción muscular.

Otro subtipo de receptores α -adrenérgicos uretrales de importancia funcional son los receptores α_2 . Se ha sugerido su papel como moduladores de la liberación de NA de los nervios adrenérgicos en diversas especies como la humana, el conejo y el cobaya, aunque también se ha sugerido su papel en la regulación de la liberación de un mediador desconocido que podría estar afectando a la contractilidad muscular (Andersson y Wein, 2004; Canda *et al.*, 2008).

Por último los receptores β -adrenérgicos también han sido localizados en la uretra humana y de animales (Ek *et al.*, 1977; Persson y Andersson, 1976; Latifpour *et al.*,

1990). En humanos se ha sugerido que en el cuello de la vejiga se encuentran principalmente adrenoreceptores del subtipo β_2 (Levin *et al.*, 1988) así como en la uretra de la mayoría de los animales estudiados, mientras que en el EUE de humanos aparece principalmente el subtipo β_3 (Morita *et al.*, 2000). La funcionalidad de estos receptores en la uretra no se ha establecido claramente, aunque se ha demostrado que su estimulación tiene un efecto relajante (Andersson y Sjögren, 1982), y que su bloqueo puede estar relacionado con un aumento de la actividad contráctil α -adrenérgica (Andersson y Wein, 2004).

- Neurotransmisión nitrérgica

El NO es un radical libre no cargado compuesto por un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno, y que presenta un electrón desapareado (Nathan, 1992). Al no tener carga difunde libremente a través de la capa lipídica de las membranas biológicas, convirtiéndose además en una molécula altamente reactiva gracias al electrón libre desapareado que presenta. La síntesis del NO es llevada cabo *in vivo* por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) que catalizan la reacción del oxígeno molecular con el aminoácido L-arginina para producir NO y citrulina, pasando por un intermediario conocido como N^w-Hidroxi-L-arginina (Stuehr *et al.*, 1991). Existen tres isoformas de esta enzima que difieren en cuanto a su localización, regulación y expresión: i) neuronal (nNOS o NOS I); ii) endotelial (eNOS o NOS III); iii) inducible (iNOS o NOS II). Estas tres formas están constituidas por subunidades diméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 Kda (Knowles y Moncada, 1994) y tienen en común que todas utilizan flavín-mononucleótido, flavín-adenín-dinucleótido, tetrahidrobiopterina, protoporfirina-IX-hemo y dinucleótido de nicotín-adenín-fosfato reducido (NADPH) como cofactores. Las tres isoformas contienen un dominio carboxi-terminal homólogo al citocromo P450, con una flavina como grupo prostético. Estos dominios terminales están conectados por un tercer dominio, que es afín a la calmodulina (CaM). La unión a la CaM parece ser el “interruptor molecular” que permite el flujo de electrones desde el dominio reductasa hacia el grupo hemo, permitiendo así la transformación del O₂ y L-arginina en NO y L-citrulina (Kelly *et al.*, 1996). Dos de estas isoformas, eNOS y nNOS, se encuentran siempre presentes en la célula y se denominan constitutivas, mientras que la tercera isoforma, iNOS es inducible, es decir, se expresa en las células tan sólo después de su estimulación por las citoquinas, microbios o productos microbianos. Ambas isoformas constitutivas se activan sólo cuando el Ca²⁺ liberado en la célula forma complejos de CaM y se une a la enzima, por lo que estas isoformas son activadas por estímulos que aumentan los niveles de Ca²⁺ intracelular generando niveles moderados de NO (picomoles) de forma pasajera. Este hecho le permite actuar como señalizador celular y mensajero intercelular. En cambio iNOS posee una unión fija a CaM, circunstancia que permite a la enzima ser activada por los niveles basales de Ca²⁺ en las células y mantenerla así en estado activo

(Cho *et al.*, 1992) generando altas cantidades de NO (micromoles) por largos periodos de tiempo que pueden tener efectos citotóxicos sobre las propias células productoras o células vecinas.

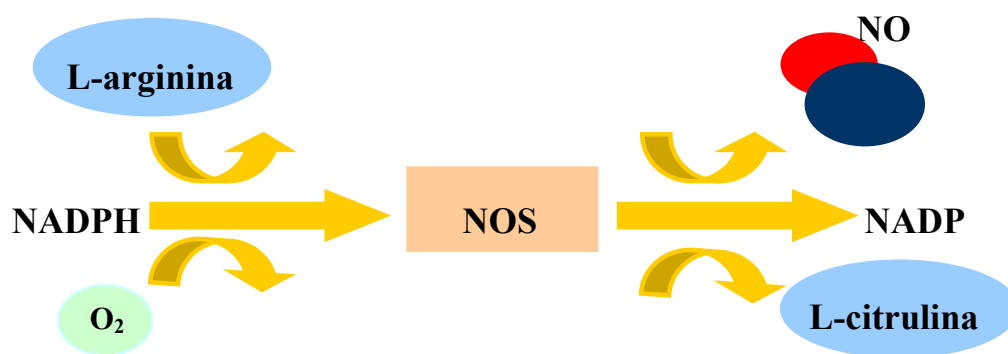


Figura IV. Biosíntesis del óxido nítrico.

Las isoformas constitutivas nNOS (nervios) y eNOS (urotelio y endotelio) constituyen la principal fuente de producción de NO en el tracto urinario inferior (Mumtaz *et al.*, 2000). La innervación nitrérgica (conteniendo nNOS) ha sido descrita a lo largo de todo el tracto urinario inferior localizada tanto en la capa muscular como en la lámina propia próxima al urotelio (Mumtaz *et al.*, 2000), cuya densidad varía siendo muy escasa en el detrusor y aumentando considerablemente en trigono, cuello vesical y uretra (Persson *et al.*, 1993; Triguero *et al.*, 1993). La mayoría de los nervios nitrérgicos también presentan inmunorreactividad a VACHT, y por lo tanto se considera que son nervios colinérgicos (Andersson y Wein, 2004). Además, se han identificado numerosos ganglios intramurales nitrérgicos, más abundantes en la región basal de la vejiga y en la uretra proximal (Zhou y Ling, 1999).

Dicha variación en la distribución se correlaciona con el papel relajante del NO mediando la rápida apertura del cuello vesical y de la uretra durante la micción. En preparaciones uretrales de diversas especies, la EFS origina una relajación frecuencia-dependiente ampliamente reducida por inhibidores de la NOS (García-Pascual *et al.*, 1991b; Andersson *et al.*, 1992; García-Pascual y Triguero, 1994). Además, la administración exógena de donantes de NO causa en estas preparaciones relajaciones dosis-dependientes similares (Mamas *et al.*, 2003). Se ha descrito que el NO produce relajación muscular por medio de la activación de la guanilato ciclasa soluble (GC) aumentando así el guanosin monofosfato cíclico (cGMP; García-Pascual y Triguero, 1994), el cual a su vez activa a la proteína quinasa dependiente de cGMP de tipo I (PKG I; Komalavilas y Lincoln, 1994; Sawada *et al.*, 2001; Bonnevier y Arner, 2004). La

activación de PKG I incrementaría la fosforilación de numerosas proteínas, entre ellas se encuentran canales de K^+ de membrana, cuya fosforilación incrementa su probabilidad de apertura hiperpolarizando la membrana (Peng *et al.*, 1996). También se ha propuesto que el cGMP podría relajar el tejido disminuyendo la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} o reduciendo los niveles de Ca^{2+} intracelular (Warner, 1994). Más recientemente se ha descrito la participación de canales catiónicos operados por cGMP (CNG) en la relajación uretral (Triguero *et al.*, 2009).

En el EUE también se ha detectado inmunorreactividad a nNOS en el sarcolema de las fibras estriadas así como en troncos o finas terminaciones nerviosas (González-Soriano *et al.*, 2003; García-Pascual *et al.*, 2005). Además, la acumulación especial de nNOS a nivel de la placa motora sugiere un papel modulador del NO en la neurotransmisión muscular estriada (García-Pascual *et al.*, 2005). Sin embargo el verdadero papel funcional del NO en esta zona aún no ha quedado establecida de forma clara (Mumtaz *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado la existencia de una alta inmunorreactividad a cGMP en el sarcolema del EUE, especialmente localizado en la placa motora. Sin embargo el hecho de que diversos inhibidores de la vía GC-cGMP no sean capaces de alterar la contractilidad *in vitro* del esfínter uretral externo hace dudar de su implicación funcional (García-Pascual *et al.*, 2010).

En preparaciones de músculo detrusor no es posible originar respuestas relajantes en respuesta a EFS, y su sensibilidad a donantes de NO es muy inferior a la observada en la uretra (Mamas *et al.*, 2003). Estos hechos se correlacionan con la escasa inervación nitrérgica existente en esta zona, sugiriendo que el NO no juegue un papel importante, donde además cabe destacar que el cAMP es el principal responsable de la relajación muscular (Morita *et al.*, 1992a,b). Otros autores, sin embargo, sostienen un posible papel del NO en la funcionalidad vesical, en base a diversas observaciones como son que se produzca hiperactividad y disminución de la capacidad vesical *in vivo* por la adición de diferentes inhibidores de la NOS en rata (Nishizawa *et al.*, 1992; Persson *et al.*, 1992) o en ratones deficientes en la PKG I (Persson *et al.*, 2000). Aunque también existen resultados contradictorios a este respecto, como es el aumento en la actividad contráctil espontánea en vejiga completa aislada por la acción del nitroprusiato sódico, un donante de NO (Gillespie *et al.*, 2005). En detrusor humano previamente contraído con carbacol se ha descrito que la adición de donantes de NO o de análogos del cGMP origina una respuesta compleja, contráctil, relajante o bifásica, sin definirse de forma clara el papel del NO en la misma (Moon, 2002).

Hay que tener en cuenta que los efectos *in vivo* podrían tener su origen en la acción de las drogas sobre la vía aferente vesical que regula el reflejo de micción. A este respecto, se ha postulado que el NO podría ser un factor que actuara acomodando la vejiga a un creciente volumen de orina durante la fase de continencia (Mumtaz *et al.*,

2000), de manera similar a como ocurre en el estómago (Desai *et al.*, 1991). Este mecanismo se activaría por medio de las funciones sensoriales del urotelio (Mamas *et al.*, 2003; Birder, 2010). De igual forma, se ha comprobado un papel regulador del flujo sanguíneo durante las fases de llenado y vaciamiento vesical por NO (Kozłowski *et al.*, 1999). La densa red de nervios nitrérgicos presente debajo del urotelio, tanto de vejiga como de uretra, permitiría un posible papel aferente de la misma estando en relación directa con el urotelio de forma bidireccional. La producción de NO a nivel nervioso actuaría sobre el urotelio y a la inversa la producción de diversos mediadores por parte de las células uroteliales (NO, ATP, ACh) regularía la liberación neuronal aferente de NO (Andersson y Wein, 2004).

Por último se ha planteado que la ruta NO/cGMP pueda cumplir funciones de neuromodulación en el tracto urinario inferior (Andersson y Wein, 2004). Así se ha descrito que el nitroprusiato sódico puede modular las respuestas contráctiles del detrusor inducidas por EFS (Liu y Lin-Shiau, 1997). A la inversa, el bloqueo presináptico de los receptores α -adrenérgicos afecta a la relajación muscular nitrérgica de la uretra del conejo (Yoshida *et al.*, 1998), mostrándose la íntima relación existente entre la vía nitrérgica con la adrenérgica y la colinérgica tanto en uretra como en vejiga.

- Neurotransmisión purinérgica

Parte de la contracción inducida por EFS en preparaciones *in vitro* de detrusor es resistente a atropina, sugiriendo la coliberación de algún otro neurotransmisor contráctil junto con ACh. Esta respuesta residual es abolida en presencia de α,β -metilen-ATP, capaz de provocar la sensibilización de los receptores purinérgicos, señalando así al ATP como el posible mediador de esta respuesta residual (Hoyle *et al.*, 1989; Ruggieri *et al.*, 1990; Palea *et al.*, 1993; O'Reilly *et al.*, 2002). Es importante señalar que la magnitud relativa de este componente purinérgico de la contracción neurogénica vesical varía entre distintas especies, siendo casi nulo en el detrusor humano sano. Sin embargo, en disfunciones vesicales humanas, tales como en la hiperactividad vesical, parece aumentar el componente contráctil resistente a atropina hasta incluso superar el 50% de la respuesta contráctil total (Bayliss *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 2002).

El ATP coliberado con la ACh desde nervios parasimpáticos actuaría sobre los receptores purinérgicos originando la contracción (Fry *et al.*, 2010). Los receptores purinérgicos descritos hasta el momento se han clasificado como receptores P1, específicos de adenosina, y P2 que son selectivos de ATP y adenosín difosfato. A su vez los receptores P2 se subdividen en P2X y P2Y, siendo los P2X receptores ionotrópicos y los P2Y receptores acoplados a proteína-G. Además se han identificado 4 subtipos de receptores P1, 7 subtipos de P2X y 8 subtipos de P2Y, incluyendo algunos reactivos a pirimidinas, uridín trifosfato y uridín difosfato (Burnstock, 2009). Los efectos

contráctiles del ATP en vejiga son mediados fundamentalmente a través de la estimulación de los receptores P2X₁ (Hardy *et al.*, 2000; Elneil *et al.*, 2001). Estos receptores ionotrópicos son canales catiónicos no específicos cuya activación genera una corriente de Na⁺ y Ca²⁺ hacia el interior celular que activa los canales de Ca²⁺ tipo L, provocando una despolarización y el influjo de mayores cantidades de Ca²⁺ a la célula (Wu *et al.*, 1999; Fry *et al.*, 2010). Este influjo de Ca²⁺ puede directamente activar las proteínas contráctiles musculares, o provocar una liberación adicional de Ca²⁺ de depósitos intracelulares mediante el mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio (Fry *et al.*, 2010).

Otros subtipos de receptores purinérgicos P2X podrían tener un papel funcional en la vejiga. Entre ellos el subtipo P2X₃ se ha localizado en fibras nerviosas inervando la vejiga de ratones normales, y su pérdida provoca hiporeflexia vesical disminuyendo la frecuencia de micción e incrementando su llenado. Se ha sugerido que este subtipo de receptor podría modular la actividad aferente de la vejiga (Andersson y Wein, 2004). El ATP que activaría estos receptores situados en los nervios aferentes posiblemente se liberaría desde el urotelio por distensión mecánica de la vejiga. De hecho se ha comprobado que la liberación de ATP en la vejiga proviene en su mayor parte de fuentes no neuronales (Kumar *et al.*, 2004).

En cuanto a los receptores P2Y se ha postulado que podrían estar implicados en procesos de relajación muscular vesical y uretral (Mc Murray *et al.*, 1998). En la vejiga se ha sugerido su participación en la relajación muscular actuando mediante aumentos en los niveles de cAMP y activación de la PKA, aunque no se ha determinado el subtipo de receptor involucrado (Mc Murray *et al.*, 1998). En la uretra se ha descrito un efecto relajante del ATP sobre preparaciones precontraídas de uretra de cobaya (Callahan y Creed, 1981), mientras que en el conejo (Ohnishi *et al.*, 1997) y hámster (Pinna *et al.*, 2005) se ha demostrado un efecto inhibitor de la relajación uretral inducida por EFS con antagonistas de los receptores P2Y, y que además la adición de ATP exógeno produce relajaciones del tejido dosis-dependientes (Pinna *et al.*, 2005).

La hidrólisis del ATP produce adenosina la cual también puede actuar sobre receptores purinérgicos P1, acoplados a la ruta proteínas G-adenilato ciclasa. La acción de esta vía no es muy conocida, aunque se ha observado que la adenosina podría relajar la vejiga activando el subtipo A₂ de los receptores P1 (Fry *et al.*, 2010).

- Otros neurotransmisores

El tracto urinario inferior sintetiza y libera diversos neuropéptidos, de entre los cuales varias taquininas como SP y las neuroquininas A y B (Maggi, 1993, 1995; Lecci y Maggi, 2001) han sido localizadas en los nervios aferentes, sugiriéndose su

participación en procesos sensoriales, como efectores directos o como neuromoduladores a nivel ganglionar. En el detrusor humano tienen una actividad contráctil (Andersson y Wein, 2004), y se sospecha su participación en el componente nervioso atropina-resistente. En la uretra, las taquininas también causan contracción en varias especies incluidos los humanos aunque, al igual que en la vejiga, su papel fisiológico no está muy claro (Canda *et al.*, 2008).

La presencia de CGRP ha sido descrita en nervios de la capa muscular y lámina propia de vejiga de rata (Gabella y Davis, 1998) e incluso se ha descrito su efecto relajante en preparaciones de cuello vesical del cobaya (Maggi *et al.*, 1992). Sin embargo, en humanos sólo se han encontrado sus receptores en vasos sanguíneos (Burcher *et al.*, 2000), limitando su participación a la vasodilatación de la vejiga. Se ha descrito un potente efecto vasodilatador del CGRP independiente del endotelio (50 veces más potente que el de la ACh) en arterias vesicales del conejo, mientras que no tiene efecto directo sobre el músculo detrusor (Persson *et al.*, 1991).

No obstante, el neuropéptido más extensamente estudiado es el péptido intestinal vasoactivo (VIP), presente en el detrusor humano en un denso plexo de nervios subepiteliales que se proyectan hacia los haces musculares (Smet *et al.*, 1997). Inicialmente implicado en la inhibición de las contracciones vesicales espontáneas (Kinder *et al.*, 1985; Sjögren *et al.*, 1985), el VIP parece tener un efecto relajante sobre preparaciones precontraídas con carbachol, asociado a un incremento en los niveles de cGMP y cAMP (Andersson y Wein, 2004). En la uretra humana y de otros mamíferos también se han localizado nervios inmunorreactivos a VIP, donde inhibe las contracciones inducidas tanto por EFS como por NA, carbachol, prostaglandina $\text{PGF}_2\alpha$ y SP, sugiriendo un efecto postsináptico (Canda *et al.*, 2008). Pese a ello el papel del VIP en el tracto urinario inferior no está firmemente establecido hasta el momento.

La vejiga humana por otra parte también es rica en nervios que contienen neuropéptido Y (NPY), sin embargo se han encontrado muy pocos receptores NPY funcionales en el detrusor, y ningún efecto de este péptido sobre la contractilidad del tejido, aunque en otras especies animales como en rata sí parece potenciar la transmisión no colinérgica (Andersson y Wein, 2004). En la uretra de conejo y rata se ha descrito un efecto inhibitorio de la contractilidad (Canda *et al.*, 2008).

Finalmente, en la uretra se ha estudiado la participación del monóxido de carbono (CO) en la relajación muscular, aunque las conclusiones a este respecto presentes en la bibliografía difieren según la especie estudiada. El CO es producido por la hemo-oxigenasa 1 y 2 (HO-1 y HO-2), presentes en fibras nerviosas de la uretra del cerdo, donde se ha visto que el CO causa relajación con un aumento de los niveles de cGMP (Werkström *et al.*, 1997). Sin embargo, en la uretra del conejo no se ha encontrado ni

inmunorreactividad a HO-1 y HO-2 ni un efecto relajante del CO (Andersson y Wein, 2004). En cobaya se encontró inmunorreactividad a HO-2 en ganglios intramurales del detrusor, cuello vesical y uretra proximal, pero las relajaciones producidas por EFS resistentes a 1H-(1,2,4)-oxadiazolo (4,3)-alquinoxalin-1-one (ODQ) o N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG), también lo fueron a antagonistas del CO (Andersson y Wein, 2004), sugiriendo la participación de otro neurotransmisor.

1.1.3.2. Autacoides: prostaglandinas

Factores biológicos liberados en el tracto urinario inferior a nivel local (autacoides) también podrían estar regulando directa o indirectamente la contractilidad del músculo liso vesical y uretral. Entre ellos se ha visto que la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) puede contraer la vejiga activando receptores musculares o bien facilitando la liberación de ACh o de ATP. Estos efectos sin embargo parece que varían según la especie y el receptor implicado. En el caso de la vejiga humana aunque se han encontrado receptores 5-HT su importancia en la funcionalidad vesical no está clara (Andersson y Wein, 2004). En la uretra se ha sugerido que la 5-HT, junto con la NA, podría modular la neurotransmisión colinérgica del esfínter facilitando su contracción (Schuessler, 2006).

La histamina también se ha comprobado que tiene un efecto contráctil en la vejiga probablemente actuando como neuromodulador de la transmisión simpática o parasimpática, aunque parece estar especialmente implicado en reacciones inflamatorias (Andersson, 1993). Un papel similar se le ha atribuido a las bradiquininas (Andersson y Wein, 2004), como agentes contráctiles del detrusor (Erspamer *et al.*, 1973; Andersson, 1993), y que podrían estar relacionados con la síntesis de prostanoides, los que a su vez estimularían la innervación sensorial (Maggi *et al.*, 1989).

La presencia de endotelina (ET) en el tracto urinario inferior de animales y humanos también ha sido establecida. Se han encontrado receptores para ET-1 en la capa muscular longitudinal externa, en vasos y en la submucosa de la vejiga y de la uretra del conejo (García-Pascual *et al.*, 1990) y también en la humana, donde además adicionalmente se han localizado en la serosa, en el epitelio y en fibroblastos (Saenz de Tejada *et al.*, 1992). La densidad de los receptores ET parece ser mayor en la cúpula vesical que en el cuello y en la uretra (Latifpour *et al.*, 1995; Mumtaz *et al.*, 1999a). La ET induce una contracción lenta del músculo cuyo mecanismo de acción varía según la especie estudiada, aunque parece involucrar la activación de canales de Ca⁺² tipo L y la activación de la PLC. No obstante el papel funcional de este péptido en la vejiga, como en los casos anteriores, aún no está claramente establecido (Andersson y Wein, 2004). En la uretra se ha sugerido que presentan un efecto modulador sobre la contractilidad del músculo liso visceral y vascular (García-Pascual *et al.*, 1993).

Cabe destacar especialmente el papel de diversos prostanoides en la funcionalidad vesical y uretral. Está firmemente establecido que tanto en la mucosa como en la capa muscular de la vejiga se sintetizan prostanoides (PGs y tromboxanos) por la ciclooxigenasa (COX) presente en estos tejidos en sus dos isoformas (COX-1 o constitutiva, y COX-2 o inducible, activa durante la inflamación) (Brown *et al.*, 1980; Jeremy *et al.*, 1987; Maggi, 1992; Andersson, 1993; Khan *et al.*, 1998; Azadzoï *et al.*, 2003). La síntesis de estos agentes se inicia por varios estímulos fisiológicos como son la distensión de la vejiga, la estimulación nerviosa o por agentes como el ATP o mediadores inflamatorios (entre ellos la bradiquinina) (Gilmore y Vane, 1971; Maggi, 1992; Andersson, 1993; Khan *et al.*, 1998). Los tipos de prostanoides y las cantidades liberadas varían según la especie estudiada. En el caso de los humanos parecen ser las prostaglandinas PGI₂ y PGE₂ las que se liberan preferentemente (Jeremy *et al.*, 1987). El tipo de receptor y los mecanismos de acción varían según el prostanoides implicado. Dado que PGE₁, PGF_{2α} y PGE₂ originan contracciones de pequeña magnitud en preparaciones de detrusor (Andersson, 1993), parece ser que predominaría su efecto neuromodulador (Andersson y Sjögren, 1982). También se ha sugerido que podrían actuar inhibiendo la acetilcolinesterasa (Borda *et al.*, 1982) y aumentando la actividad miogénica de la vejiga (Bultitude *et al.*, 1976; Andersson y Sjögren, 1982; de Jongh *et al.*, 2007a). En este último sentido, recientemente se ha propuesto un modelo en el que la actividad espontánea de la vejiga estaría regulada por dos sistemas paralelos, uno colinérgico que controlaría la actividad fásica de la capa muscular más superficial, y otro regulado por PGs que activaría microcontracciones en las capas internas (de Jongh *et al.*, 2007a).

En la uretra el efecto de las PGs es variado. Mientras que PGF_{2α} produce contracción como en la vejiga, PGE₁ y PGE₂ originan su relajación (Andersson, 1993; Morita *et al.*, 1994; Pinna *et al.*, 1996) asociada a un incremento de cAMP en el tejido pero no de cGMP (Morita *et al.*, 1994). Por otra parte, la lentitud del efecto de las PGs no hace probable su participación directa en la micción, aunque podrían tener un papel fisiológico importante regulando la actividad aferente (Andersson y Wein, 2004).

1.1.3.3. Función del urotelio

Tradicionalmente se ha considerado al urotelio como una simple barrera de protección frente a las sustancias nocivas de la orina (Apodaca, 2004; Lewis, 2000; Negrete *et al.*, 1996; Zeidel, 1996), dada la reducida permeabilidad de su capa superficial gracias a unas proteínas transmembrana llamadas uroplaquinas (Birder, 2006). Sin embargo, la acomodación de la vejiga a volúmenes crecientes de orina sugiere que el urotelio podría responder a estímulos externos que inicialmente se limitaron a las variaciones de tensión (Birder, 2006), pero que actualmente se han

extendido al entorno químico y que permiten una comunicación tanto entre células uroteliales como entre éstas y los diferentes componentes de la submucosa, tanto plexos nerviosos, miofibroblastos y células intersticiales (ICCs; Brading y McCloskey, 2005; Wang *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2007; Grol *et al.*, 2008).

En este sentido se ha visto que las células uroteliales expresan canales iónicos y receptores que les permiten responder a la distensión vesical y a la presencia de compuestos químicos irritantes asociados a la inflamación o la infección (Birder, 2006; Chancellor y de Groat, 1999). Destacamos la presencia de receptores para purinas (P2Y y P2X), adenosinas (A₁, A₂ y A₃; Birder *et al.*, 2004; Tempest *et al.*, 2004; Sun y Chai, 2004; Lee *et al.*, 2000a), NA (α y β), ACh (muscarínicos y nicotínicos; Birder, 2010), proteasas (D'Andrea *et al.*, 2003), bradiquininas (Chopra *et al.*, 2005), y neurotrofinas (Wolf-Johnston *et al.*, 2004), así como la presencia de canales de Na⁺ amiloride/mecanosensibles (Lewis y Hanrahan, 1985; Lewis *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1998; Carattino *et al.*, 2005) y un número de canales TRP (receptores de potencial transitorio; Birder *et al.*, 2001, 2002a; Barrick *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004). Estos últimos son canales catiónicos que proporcionan a las células uroteliales sensibilidad a una diversidad de estímulos como son la distensión, la temperatura, el estrés osmótico y a una amplia variedad de compuestos químicos (Yu *et al.*, 2011).

Asimismo, se ha descrito que en respuesta a estímulos físicos y químicos, el urotelio libera múltiples mediadores (neurotrofinas, péptidos, ATP, ACh, NO, PGs y citoquinas) que a su vez son capaces de modular la actividad muscular y nerviosa (Apodaca *et al.*, 2007; Birder y de Groat, 2007). De hecho, la eliminación del urotelio en preparaciones aisladas de vejiga aumenta tanto su actividad espontánea como las contracciones neurogénicas inducidas por ACh (Fry *et al.*, 2010). En la uretra, la eliminación del urotelio aumenta las contracciones inducidas por NA y disminuye la relajación nitrérgica inducida por EFS (Pinna *et al.*, 1996).

Entre otras hipótesis se ha sugerido la participación de ICCs suburoteliales como intermediarias en las respuestas sensoriales (Brading y McCloskey, 2005; Grol *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2004), amplificando esta respuesta y mediando la señalización entre el urotelio y los nervios aferentes o la capa muscular (Fry *et al.*, 2007), modulación que podría producirse también en sentido inverso (Birder, 2006).

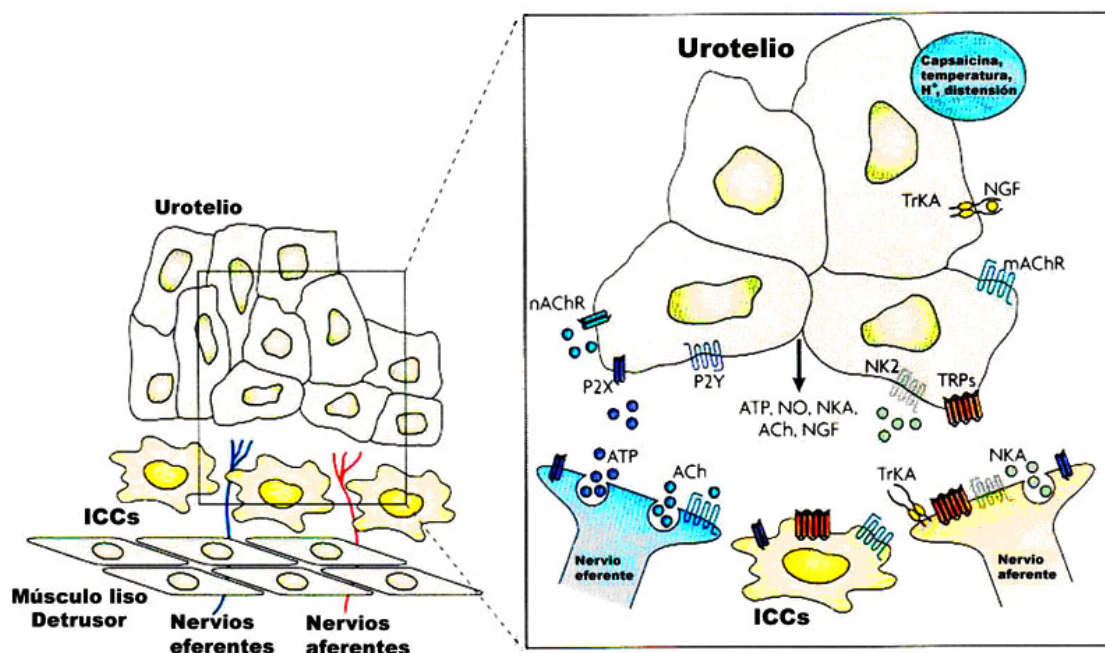


Figura V. Modelo que ilustra las posibles interacciones químicas entre las células uroteliales, los nervios aferentes y eferentes, y las ICCs en la vejiga. P2X y P2Y: receptores purinérgicos; TRPs: receptores de potencial transitorio; NKA: neuroquinina A; NGF: factor de crecimiento nervioso; TrkA: receptores de la tirosinquinasa A; NK2: receptor de la neuroquinina 2; NO: óxido nítrico; ACh: acetilcolina; nAChR y mAChR: receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos respectivamente (Fowler *et al.*, 2008).

1.1.3.4. Papel de las células intersticiales de Cajal

Entre todos sus descubrimientos D. Santiago Ramón y Cajal encontró en los plexos nerviosos del intestino de rana (1892) y de mamíferos (1911) “ciertos corpúsculos nerviosos” que por su morfología (expansiones largas, varicosas y ramificadas) y otras características (tintoriales y relación con las fibras nerviosas) consideró como neuronas de carácter primitivo. En la actualidad se conoce a estas células como células intersticiales de Cajal (ICCs) y se considera que son de origen mesenquimatoso (Young *et al.*, 1996), al igual que las células musculares lisas, produciéndose la transformación fenotípica de unas en otras en función del ambiente químico (Sanders, 2006). No obstante, existen otros autores que establecen que al menos una parte de las ICCs sí se originaría a partir de células multipotentes procedentes de la parte ventral del tubo neural (células VENT: *ventrally emigrating neural tube*; Sohal *et al.*, 2002), estando esto de acuerdo con los planteamientos iniciales de Cajal.

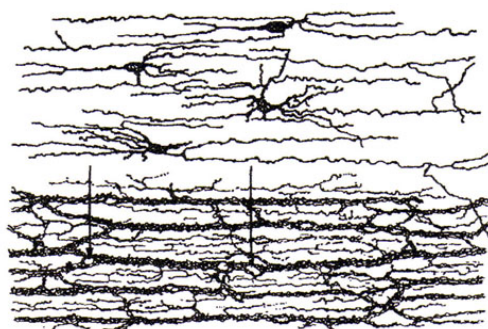


Figura VI. Dibujo realizado por Cajal (1911) de las células intersticiales situadas en el plexo muscular profundo del intestino. En la parte superior se muestran éstas, mientras que en la parte inferior están acompañadas de las fibras nerviosas. Las flechas indican los huecos reconocidos por Cajal como los cuerpos celulares de las ICCs. (Ramón y Cajal, 1911).

Las ICCs forman en ocasiones extensas y complejas redes intercaladas con células musculares lisas, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos (Huizinga, 2001; Ward y Sanders, 2001). Sus largas prolongaciones conectan con otras ICCs adyacentes mediante uniones intercelulares comunicantes conformando un verdadero sincitio.

Si bien hasta hace poco eran identificadas únicamente por la presencia de vimentina, un marcador de filamentos intermedios ausente en las células musculares (Rumessen y Thuneberg, 1996), desde el descubrimiento de la inmunorreactividad al receptor c-kit (CD117, receptor de tirosinquinasa; Lammie *et al.*, 1994; Vanderwinden *et al.*, 1996; Torihashi *et al.*, 1997), éste se ha convertido en su marcador específico hasta el punto de que muchos autores no consideran una célula intersticial como ICC si no es positiva a c-kit. Sin embargo, las células intersticiales presentes en el tracto urinario, tanto en vejiga como en uretra son difícilmente marcadas con c-kit (Pezzone *et al.*, 2003; Sergeant *et al.*, 2000). Sin embargo con el fin de unificar la nomenclatura, en el 5º Simposium Internacional sobre Células Intersticiales de Cajal celebrado en Irlanda en 2007 se acordó denominar también ICCs a estas células presentes en el tracto urinario en base a sus características ultraestructurales y función. Incluso en el intestino cada vez son más numerosos los estudios que demuestran la presencia de ICCs no reactivas a c-kit, pero que sin embargo si son positivas a vimentina o CD34 (Vanderwinden *et al.*, 1999, 2000; Goto *et al.*, 2004; Pieri *et al.*, 2008). CD34 es una glicoproteína presente en células endoteliales y células mesenquimatosas primitivas (Pusztaszeri *et al.*, 2006). El debate actual se centra en si las células positivas a estos marcadores pero negativas a c-kit serían o no verdaderas ICCs con diferente función (Vanderwinden *et al.*, 2000). El hecho de que en la vejiga se haya descrito la presencia de células positivas a CD34 pero

negativas a c-kit (Rasmussen *et al.*, 2007) abre la posibilidad de la existencia de subtipos fenotípicos de ICCs presentes en diferentes tejidos con diferente perfil funcional.

En cuanto a la funcionalidad de estas células en la actualidad se considera que ésta puede variar según su localización. En el tracto gastrointestinal las ICCs presentes en el plexo mientérico actúan como *marcapasos*, generando las oscilaciones espontáneas eléctricas rítmicas (*ondas lentas*) que controlan la actividad gastrointestinal. Esta actividad depende del intercambio de Ca^{2+} entre compartimentos intracelulares (mitocondrias y retículo sarcoplásmico), mediado por bombas, canales específicos y receptores IP_3 (Liu *et al.*, 1995; Sanders *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000a) originando oscilaciones rítmicas del Ca^{2+} citosólico. En cambio las ICCs del plexo muscular profundo parece que actúan como mediadoras de la neurotransmisión, puesto que se ha observado que son capaces de responder a muchos neurotransmisores y hormonas, tales como ACh, NO, SP o colecistoquinina (Ward *et al.*, 2000b; Forrest *et al.*, 2006; Takayama *et al.*, 2002). Por ejemplo, la presencia de GC y la capacidad para responder al NO con aumentos de cGMP intracelular es una propiedad demostrada en muchos tipos de ICCs del tracto gastrointestinal (Shuttleworth *et al.*, 1993; Beckett *et al.*, 2002). Sin embargo no se conoce con exactitud cómo se transmite el mensaje desde las ICCs a las células musculares lisas. La hipótesis clásica sustenta la transmisión eléctrica gracias a la existencia de uniones intercelulares comunicantes entre estas células. De forma alternativa, las ICCs podrían liberar mediadores químicos que alcanzarían a las células musculares (Hirst y Edwards, 2004) y que podrían actuar en las uniones similares a sinapsis descritas entre ICCs y células musculares lisas (Harhun *et al.*, 2004).

La presencia de ICCs se ha demostrado en una amplia variedad de tejidos entre los que se encuentran diferentes estructuras del tracto urinario inferior, como son el uréter (Metzger *et al.*, 2004), la próstata (Exintaris *et al.*, 2002), la vejiga (Shafik *et al.*, 2004) y la uretra (Sergeant *et al.*, 2000). En la vejiga se han observado tres subpoblaciones de ICCs clasificadas según su localización en ICCs suburoteliales o de la lámina propia (ICC-LP), ICCs septales, situadas alrededor de los fascículos de músculo liso (ICC-SEP), y por último ICCs intramusculares, dentro de los propios fascículos (ICC-IM; Andersson, 2010).

Las ICC-LP presentan una morfología estrellada con numerosas prolongaciones muy interconectadas formando una densa red en estrecho contacto con las terminaciones nerviosas aferentes de la zona (McCloskey, 2010). Responden a la adición de ATP generando aumentos de Ca^{2+} intracelular que parecen estar asociados a la entrada de Cl^- a través de canales activados por Ca^{2+} (Wu *et al.*, 2004). Más recientemente, se ha observado que dicho efecto puede ser atenuado por el aumento de cGMP inducido por NO (Gillespie *et al.*, 2006; Sui *et al.*, 2008).

En el caso de las ICC-SEP e ICC-IM vesicales, se ha descrito la aparición de ondas lentas durante el llenado vesical (McCloskey y Gurney, 2002). No obstante, el hecho de que las células musculares lisas del detrusor presenten actividad eléctrica de manera espontánea (Hashitani *et al.*, 2004) sugiere que la participación de las ICCs sería meramente moduladora (Hashitani *et al.*, 2004; McHale *et al.*, 2006) contribuyendo a su coordinación. Más concretamente, se ha sugerido que éstas actuarían, a través de receptores muscarínicos M₃ presentes en ICCs (McCloskey, 2010), como intermediarias de la actividad colinérgica vesical. Otros autores han planteado que la estimulación de las ICCs podría mediar la liberación de diversas sustancias como PGs, responsables de microcontracciones vesicales (de Jongh *et al.*, 2007a), hipótesis que se ha visto reforzada por la elevada expresión de COX-1 y COX-2 y cuya inhibición disminuye la actividad espontánea vesical (Collins *et al.*, 2009).

Por último, el hecho de que la adición de donantes de NO induce aumentos de cGMP limitados a ICCs, ha llevado a algunos autores a considerar su implicación en el control nitrérgico vesical (Smet *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 2004), si bien la ausencia de un efecto directo de la ruta NO-cGMP sobre la contractilidad del detrusor (Moon, 2002), y la amplísima variabilidad interespecífica en el efecto de donantes de NO sobre la actividad fásica vesical (Gillespie *et al.*, 2004; Lagou *et al.*, 2006a; Artim *et al.*, 2009) arroja serias dudas al respecto.

En el caso de la uretra, también se ha descrito la presencia de diversas poblaciones de ICCs (Sergeant *et al.*, 2000; García-Pascual *et al.*, 2008). En la uretra de conejo, dichas ICCs presentan actividad espontánea, habiéndose sugerido su papel como “marcapasos” del tono miogénico en esta especie, a través de canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ (Sergeant *et al.*, 2006; McHale *et al.*, 2006). No obstante su mecanismo diferiría del postulado en sus equivalentes en el tracto gastrointestinal, ya que parece desencadenarse por la entrada de Ca²⁺ gracias al intercambiador Na⁺-Ca²⁺ funcionando en sentido inverso (Bradley *et al.*, 2006). La necesidad de una actividad miogénica en un órgano con actividad preferentemente tónica como es la uretra, capaz de mantener un estado contráctil elevado durante la continencia urinaria, es sin embargo controvertida. A este respecto, se ha postulado que es precisamente la actividad miogénica asincrónica de grupos de células musculares lisas uretrales la que mantiene el grado de tensión muscular con el mínimo gasto de energía (Sergeant *et al.*, 2000), lo que daría sentido al papel de las ICCs como marcapasos uretral.

También se ha sugerido la participación de estas células en la mediación de la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria de la uretra. Así, la adición de agonistas α -adrenérgicos a ICCs aisladas procedentes de uretra de conejo incrementa su actividad espontánea por un mecanismo mediado por canales de Cl⁻, mientras que la adición de donantes de NO o análogos de cGMP origina una reducción de dicha actividad

espontánea, sugiriendo la participación de las ICCs en la neurotransmisión tanto excitatoria noradrenérgica como inhibitoria nitrérgica (Sergeant *et al.*, 2002, 2006).

Recientemente se ha sugerido la participación de una subpoblación de ICCs uretrales en el control nitrérgico funcional, demostrando la acumulación de cGMP en una fracción de las ICC-IM en respuesta a la liberación de NO de las terminaciones intramurales inducida por EFS, frente al aumento generalizado que se produce por donantes de NO (García-Pascual *et al.*, 2008). Además, el hallazgo de CNG en las ICCs de uretra de rata, pero no en células musculares lisas, y su participación en la relajación nitrérgica uretral (Triguero *et al.*, 2009), abren la posibilidad de que dichas ICCs participen como mediadores directos del NO liberado de los nervios, actuando como intermediarias entre los nervios y el efector final que es el músculo liso.

1.1.3.5. Diferencias de género en la función vesical y uretral

El estudio de las diferencias de género en la funcionalidad del tracto urinario inferior empezó a cobrar importancia al observarse que existen ciertos tipos de incontinencia que afectan predominantemente al sexo femenino (Michel y Barendrecht, 2008). Diferencias anatómicas en la uretra de ambos sexos, como la longitud (menor en la hembra; Gleason *et al.*, 1976) y la presencia de la próstata y de una capa de músculo estriado de mayor grosor en el macho (Watanabe y Yamamoto, 1979; Andersson *et al.*, 1990; Brading, 1999), así como diferencias hormonales, podrían estar afectando los mecanismos de control miccional.

El análisis de los antecedentes al respecto es muy contradictorio. Un elevado número de estudios *in vitro* muestran que la respuesta de la vejiga tanto a EFS (Dambros *et al.*, 2004; Longhurst y Levendusky, 2000; Fry *et al.*, 2010) como a agonistas colinérgicos y purinérgicos (Choppin, 2002; Kories *et al.*, 2003; An *et al.*, 2002; Fry *et al.*, 2010) es semejante en ambos sexos, así como la densidad de los distintos subtipos de receptores muscarínicos (Michel y Barendrecht, 2008), lo que apoyaría que tales diferencias sean consecuencia de factores uretrales y no vesicales (Van der Werf y Creed, 2002). Por otra parte, estudios en humanos sí han revelado diferencias en la densidad de receptores muscarínicos vesicales, con una mayor expresión de los receptores M₂ en el hombre tanto a nivel muscular como de lámina propia, y que estos últimos se ven incrementados con el envejecimiento en las mujeres mientras que en los hombres disminuyen (Arrighi *et al.*, 2008). Además, en ratones *knock-out* para el receptor M₃ los machos presentan mayor dificultad para orinar que las hembras (Matsui *et al.*, 2000), sugiriéndonos que sí existe alguna diferencia de género en la funcionalidad vesical al menos en esta especie. Recientemente se ha descrito que, en cobaya y rata, el componente purinérgico que media la parte fásica de la contracción nerviosa vesical es mayor en machos que en hembras (Creed *et al.*, 2010) junto con mayores niveles en la

expresión de los receptores P2X₃ y P2X₆ en las hembras que en los machos, donde la expresión es muy baja.

Aún más variables son los antecedentes relativos a diferencias en la actividad relajante, particularmente en los mecanismos β -adrenérgicos (Michel y Barendrecht, 2008), sin encontrarse hasta el momento resultados concluyentes a este respecto. Por lo que concierne a la expresión de los receptores α -adrenérgicos no se han observado diferencias de género ni en el detrusor ni en el cuello vesical de rata (Walden *et al.*, 1997), conejo (Latifpour *et al.*, 1990) o humanos (Sigala *et al.*, 2004).

Por otro lado, la vejiga del perro posee mayor expresión de la enzima COX-2, así como mayor expresión de los receptores EP₁ en la hembra que en el macho (Ponglowhapan *et al.*, 2009-2010), sugiriendo un mayor papel de la PGE₂ en la funcionalidad vesical de las hembras. Los mismos autores observan que la uretra proximal también expresa estos receptores, aunque en este caso la expresión en las hembras parece ser menor que en los machos, sin aclararse que efectos podría tener sobre la micción.

Por otra parte en la uretra sí se ha sugerido que la distribución de los receptores α -adrenérgicos está relacionada con el sexo, predominando en el macho los receptores α_1 y en la hembra los α_2 (Levin *et al.*, 1988; Andersson *et al.*, 1984), variaciones que podrían estar relacionadas con los niveles hormonales.

A pesar de todas estas observaciones, no se ha establecido la repercusión que estas pequeñas diferencias podrían tener en la funcionalidad del tracto urinario inferior del macho y de la hembra, ni si alguna de ellas podría asumir algún papel en la mayor prevalencia de disfunción urinaria en el sexo femenino.

1.2. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN EL TRACTO URINARIO INFERIOR: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD

Las disfunciones del tracto urinario inferior son uno de los problemas médicos más comunes durante el envejecimiento, siendo más frecuentes que las disfunciones cardiovasculares o la artritis reumatoide. Se estima que entre el 15 y el 30% de las personas de 60 años sufren pérdidas de orina o tienen dificultad para orinar, mientras que la misma proporción de octogenarios presentan incontinencia urinaria, encontrándose el doble de mujeres afectadas que de hombres (Madersbacher *et al.*, 1998). A pesar de la gran repercusión médica, psicológica y económica que estas patologías provocan en la sociedad actual poco se sabe sobre los mecanismos concretos que se encuentran alterados y que las provocan, en parte debido a la escasez de material humano para su investigación.

Son diversas las disfunciones urinarias que se pueden dar durante la senectud, aunque todas presentan una sintomatología común, constituyendo un síndrome denominado LUTS (*lower urinary tract symptoms*). Estos síntomas pueden clasificarse como síntomas asociados al llenado o irritativos, como la urgencia, frecuencia, disuria (micción difícil, dolorosa e incompleta) y nocturia (necesidad de orinar durante la noche, interrumpiendo el sueño); o como asociados al vaciamiento vesical u obstructivos, como hesitancia (demora para empezar la micción), incontinencia o flujo de micción pobre; así como postmicciones como vaciamiento incompleto o goteo postmiccional; incluyendo otros asociados, como hematuria (presencia de sangre en la orina) o dolor pélvico (Homma, 2008). Aunque no son específicos de género, diversos estudios muestran que son más frecuentes en mujeres (Hampel *et al.*, 1997; Irwin *et al.*, 2006; Coyne *et al.*, 2009), suelen estar asociados a la edad y son progresivos, siendo necesario el tratamiento de todos los síntomas en conjunto (Vishwajit y Andersson, 2009).

Los LUTS están asociados a una serie de patologías muy diversas que presentan varios de estos síntomas simultáneamente. Durante la senectud la patología del tracto urinario inferior predominante es la *hiperactividad del detrusor* (Wagg y Cohen, 2002), encontrándose que un 17% de las personas mayores de 40 años presentan, como mínimo, un síntoma de esta disfunción. En los hombres el progresivo crecimiento de la próstata con la edad puede causar *obstrucción vesical* (Michel y Barendrecht, 2008). Sin embargo, en mujeres de edad avanzada, la segunda causa más habitual de disfunción urinaria es la *incontinencia de esfuerzo* que ocurre durante una actividad física como toser, estornudar, reír o realizar ejercicio, y que es debida posiblemente a un mal posicionamiento del EUI (Elbadawi, 1998).

Las principales consecuencias del envejecimiento en el tracto urinario inferior incluyen disminución en la capacidad vesical, inestabilidad del detrusor y, particularmente en mujeres, reducción en la resistencia uretral (Lluel *et al.*, 2000). Aunque las causas que provocan estas disfunciones no están muy claras, se ha postulado que pueden resultar de alteraciones en las sensaciones de llenado, en el control nervioso central o periférico de la micción, en la contractilidad de la musculatura del tracto urinario inferior o quizá una combinación de todos ellos (Fry *et al.*, 2011). Algunos investigadores han postulado que en la patofisiología de la disfunción urinaria asociada a la vejez podrían estar interviniendo también otras patologías típicas de la edad como la hipercolesterolemia o la insuficiencia arterial, ésta última asociada a la hiperactividad del detrusor y a un aumento de la contractilidad del músculo liso (Roosen *et al.*, 2009a). No obstante, los antecedentes al respecto son tan contradictorios que se hace casi imposible delimitar las implicaciones de los distintos componentes del tracto urinario.

Como ejemplo, se ha sugerido que la vejiga humana ve incrementada la proporción de tejido conectivo con la edad a expensas del músculo liso solo en el caso de las mujeres (Susset *et al.*, 1978), indistintamente del sexo (Lepor *et al.*, 1992) o en ninguno de los dos casos (Swaiman *et al.*, 1967). Otros autores han limitado dichas alteraciones al cuello vesical con una pérdida progresiva en el número de células musculares en ambos sexos (Rother *et al.*, 1996), en tanto que otros limitan a los pacientes que sufren de obstrucción vesical la aparición de hipertrofia vesical y una mayor proporción de tejido conectivo (Gosling, 1997). Por el contrario, sí existe consenso en cuanto a una disminución de la inervación con el envejecimiento (Gosling, 1997; Elbadawi *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1985; Gilpin *et al.*, 1986; Canon *et al.*, 1990), similar a la observada en vejigas hiperactivas (Brading, 1997).

En la rata el envejecimiento aumenta el grosor de la capa muscular y disminuye la densidad de colágeno tanto en capa muscular como en lámina propia (Lluel *et al.*, 2000). Warburton y Santer, 1994, descubrieron además en esta especie una denervación simpática de vejiga, uréter y uretra, y otros autores también describen una disminución de nervios nitrérgicos en trigono y cuello vesical (Mohammed y Santer, 2001). Recientemente, se ha descrito una reducción del 40% en el número de ganglios intramurales colinérgicos con el envejecimiento en la cobaya (Mizuno *et al.*, 2007).

Tanto la edad como el número de partos en mujeres parecen estar asociados con una pérdida de masa muscular que puede contribuir a la incontinencia de esfuerzo (Strasser *et al.*, 2000). Otros estudios sugieren que mientras se produce una disminución en el volumen relativo de músculo estriado a la vez que aumenta el de tejido conectivo, el músculo liso no se ve alterado por el envejecimiento (Huisman, 1983; Carlile *et al.*, 1988); sin embargo, estudios recientes apuntan que no sólo existe una disminución en el número de fibras estriadas sino que la proporción de músculo liso circular también se ve reducida por la edad, pudiendo contribuir a la pérdida de presión máxima de cierre uretral que existe en mujeres de edad avanzada (Clobes *et al.*, 2008). No obstante, tales alteraciones por envejecimiento no han sido observadas en hembras de otras especies (Russell *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 2000).

Por lo que concierne a alteraciones funcionales, en los pocos estudios realizados en humanos, no se han detectado alteraciones debidas al envejecimiento en la contractilidad del detrusor inducida por KCl, EFS o agonistas colinérgicos en preparaciones *in vitro* (Yoshida *et al.*, 2001; Wuest *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2010). Por el contrario, en pacientes que sufren de hiperactividad del detrusor sí se ha observado hipersensibilidad tanto a la estimulación muscarínica (Harrison *et al.*, 1987; Stevens *et al.*, 2007) como a EFS (Eaton y Bates, 1982; Kinder y Mundy, 1987; Kosan *et al.*, 2008), aunque otros estudios describen una disminución en la sensibilidad a la estimulación nerviosa (Harrison *et al.*, 1987), o la ausencia de variaciones de contractilidad (Fry *et al.*, 2010).

Los estudios funcionales realizados en animales comparten la misma variabilidad, habiéndose observado tanto ausencia de cambios en ratas envejecidas (Yu *et al.*, 1996), como un aumento en la sensibilidad a la estimulación nerviosa tanto en ratas como en ratones envejecidos (Longhurst *et al.*, 1992; Lai *et al.*, 2007). En lo concerniente a las modificaciones en la contractilidad muscarínica de los animales envejecidos las discrepancias se extienden incluso a estirpe: en ratas Fischer 344 el envejecimiento incrementa (Kolta *et al.*, 1984), disminuye (Zhao *et al.*, 2010) o no altera la contracción muscarínica (Ordway *et al.*, 1986), en ratas Wistar no la modifica (Lluel *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2005) y en ratas Sprague-Dawley la reduce (Lluel *et al.*, 2003a). Similarmente los estudios en ratones envejecidos tampoco son concluyentes, habiéndose sugerido tanto una reducción (Lagou *et al.*, 2006b) como un aumento de esta contracción (Lai *et al.*, 2007).

Algunos autores han sugerido que el aumento de contractilidad colinérgica se limita al cuello vesical (Ordway *et al.*, 1986) con un aumento en el número de receptores muscarínicos (Latifpour *et al.*, 1990), aunque otros investigadores no observan diferencias en este aspecto (Hayes *et al.*, 1983; Saito *et al.*, 1993).

Por otra parte, tanto en vejiga denervada de rata (Braverman *et al.*, 1998a, 1999, 2002), como en pacientes con disfunción neurogénica vesical (Braverman y Ruggieri, 2003) la contracción parece estar mediada por el receptor muscarínico M₂ y no por el M₃ como ocurre en la vejiga normal. Este hecho junto con la disminución de receptores M₃ en el detrusor humano (Mansfield *et al.*, 2005), sugiere la participación de receptores M₂ en la contracción de la vejiga envejecida. De nuevo, los estudios no son concluyentes ya que tales cambios están ausentes en machos de ratas Wistar (Schneider *et al.*, 2005), en ambos sexos Fisher 344 y en hembra de Sprague-Dawley, aunque sí se ha observado en machos de esta última estirpe (Ruggieri y Braverman, 2006).

En pacientes con inestabilidad del detrusor aparece un componente contráctil atropina-resistente en respuesta a EFS (Sjögren *et al.*, 1982; Bayliss *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 2002; Fry *et al.*, 2010), similar al observado en la cistitis intersticial (Palea *et al.*, 1993; Tempest *et al.*, 2004) y en la obstrucción vesical (Bayliss *et al.*, 1999), pero que en el caso del envejecimiento sólo ha sido descrito en uno de los estudios realizados en humanos (Yoshida *et al.*, 2001), cuyos autores proponen una disminución en el componente colinérgico contráctil de la contracción vesical en favor de un componente purinérgico, si bien no aparecen contempladas las diferentes patologías de sus pacientes. No obstante, dicho aumento de sensibilidad a la estimulación purinérgica durante el envejecimiento ha sido descrito en vejiga de rata (Saito *et al.*, 1991; Kageyama *et al.*, 2000). Estudios recientes muestran que el número de receptores purinérgicos P2X₁ en la vejiga humana envejecida o obstruida no se

encuentra alterado (Wuest *et al.*, 2005; Chua *et al.*, 2007) o que disminuye con el envejecimiento (Chua *et al.*, 2007), sugiriendo que los cambios en la respuesta al ATP observados pudieran deberse a alteraciones en la actividad de las ecto-ATPasas, como ha sido postulado por otros autores (Harvey *et al.*, 2002).

Pese a la correlación hallada entre contracción α -adrenérgica e inestabilidad vesical en pacientes con obstrucción prostática (Perlberg y Caine, 1982; Lluell *et al.*, 2000) los resultados obtenidos en vejiga de conejos y ratas envejecidas son controvertidos: si bien algunos autores no encuentran modificaciones en el efecto de fenilefrina ni en la expresión de receptores adrenérgicos (Kolta *et al.*, 1984; Latifpour *et al.*, 1990; Lluell *et al.*, 2000, 2003a,b), otros describen una mayor contractilidad y un aumento del receptor α_{1D} , especialmente en el urotelio (Suzuki *et al.*, 1999; Dmitrieva *et al.*, 2008). Otros autores han descrito una mayor contracción vesical frente a NA en animales envejecidos (Saito *et al.*, 1993; Lluell *et al.*, 2000, 2003b), habiéndose sugerido una alteración en la regulación del tono muscular mediada por los receptores β -adrenérgicos del urotelio que inducen la liberación de NO (Lluell *et al.*, 2003b). También son inconsistentes los resultados sobre receptores β -adrenérgicos vesicales, habiéndose postulado tanto una disminución en la relajación por agonistas y en el nivel de receptores (Nishimoto *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003), como ninguna alteración en la relajación (Kolta *et al.*, 1984; Lluell *et al.*, 2000; Frazier *et al.*, 2006), o un aumento en el número de receptores (Latifpour *et al.*, 1990).

De igual forma en la uretra los antecedentes difieren ampliamente, y así en hembras de conejo y perro con el envejecimiento hay un aumento de sensibilidad a fenilefrina pero no a NA (Yoshida *et al.*, 1991), no hay cambios en la sensibilidad a ninguno de los dos agonistas ni en la distribución de receptores α_{1L} -adrenérgicos (Ahmed *et al.*, 2000), o sólo se presenta hipersensibilidad a la fenilefrina en la uretra proximal (Suzuki *et al.*, 1999).

Pese a la relevancia de la vía NO/cGMP, sólo tenemos información muy dispersa sobre las modificaciones inducidas por el envejecimiento. El hecho de que la administración de inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE), capaz de aumentar la acumulación de cGMP, mejoren los LUTS (Morelli *et al.*, 2009), sugiere una alteración en la regulación del reflejo de micción. En este sentido, se ha observado una disminución de la inervación nitrérgica en la lámina propia y capa muscular de la base vesical de la rata envejecida (Mohammed y Santer, 2001). Otros autores han propuesto que la disminución generalizada de los mecanismos antioxidantes con la vejez aumentaría la sensibilidad a las especies reactivas de oxígeno (ROS) reduciendo la biodisponibilidad del NO en el tracto urinario inferior. Así, el aumento de la actividad del detrusor en ratones transgénicos con altos niveles de ión superóxido (O_2^-) se limita a los animales envejecidos (Soler *et al.*, 2010).

En la misma línea, parte de las modificaciones inducidas por la vejez en la respuesta a las PGs podrían ser originadas por prostanoïdes derivados del estrés oxidativo, como 8-epi PGF₂ α capaz de originar contracción del detrusor a concentraciones muy bajas y cuyos niveles en orina aumentan en animales envejecidos (Delanty *et al.*, 1996; Tarcan *et al.*, 2000). Otros investigadores han observado que la PGE₂ aumenta en la orina de pacientes con hiperactividad vesical, y su administración tiene el mismo efecto en ratas y ratones sanos (McCafferty *et al.*, 2008). Por último, los inhibidores de la COX son agentes efectivos en modelos de hiperactividad vesical (Roosen *et al.*, 2009a).

Los estudios recientes que muestran interacciones de las ICCs con el urotelio, los nervios aferentes y las células musculares en las vías de señalización mecanosensorial y en la comunicación celular han promovido el análisis de posibles alteraciones en ICCs en diversos procesos patológicos. Su deficiencia podría provocar desórdenes en la motilidad vesical (Shafik *et al.*, 2004), y en pacientes con hiperactividad vesical hay un aumento de células inmunorreactivas a c-kit en los haces musculares (Biers *et al.*, 2006), incremento que también se observa en la población de células suburoteliales positivas a vimentina en modelos de obstrucción vesical (Kubota *et al.*, 2008). No obstante, no se ha determinado si con el envejecimiento se produce alguna de estas alteraciones.

Reforzando dicha disfunción a nivel de comunicación celular se ha observado un incremento en el nivel de expresión de la proteína Cx43 (subunidad de conexina que forma las uniones intercelulares comunicantes) tanto en vejigas hiperactivas como obstruidas de rata (Haeffliger *et al.*, 2002; Christ *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007), así como en hiperactivas de humano tanto a nivel de las células musculares lisas (Haferkamp *et al.*, 2004) como a nivel de las ICCs suburoteliales (Roosen *et al.*, 2009b). Cx43 también parece estar aumentada en la vejiga de la rata macho envejecida (Song *et al.*, 2011), pudiendo estar relacionado con un incremento en la actividad espontánea observado tanto en el envejecimiento como en hiperactividad u obstrucción vesical (Mills *et al.*, 2000; Christ *et al.*, 2003; Fry *et al.*, 2004; Szigeti *et al.*, 2005).

Por último, con el envejecimiento también se han observado cambios en la función sensorial a nivel vesical y uretral, necesitándose de mayores volúmenes de orina y umbrales de presión para disparar el reflejo de micción, y observándose una menor respuesta a la capsaicina intravesical (Chai *et al.*, 2000; Collas *et al.*, 1996; Kenton *et al.*, 2007), habiéndose propuesto recientemente alteraciones en la mecanotransducción sensorial y/o en la sensibilidad central a la actividad aferente (Smith *et al.*, 2012). En este último sentido se ha observado mediante resonancia magnética una disminución en la actividad de las áreas cerebrales relacionadas con la estimulación vesical asociada al envejecimiento (Griffiths *et al.*, 2009). En detrusor humano el urotelio libera ACh en respuesta a la distensión vesical, liberación que aumenta con la edad, y que podría ser

uno de los factores que altera la transducción mecanoafereente (Yoshida *et al.*, 2004). Asimismo, el incremento de fibras suburoteliales inmunorreactivas a SP y CGRP (Smet *et al.*, 1997) podría ser responsable del aumento en la apreciación del llenado, frecuencia y urgencia de la micción, características de los pacientes con hiperactividad vesical (Andersson y Wein, 2004). En este sentido, la administración intravesical de un agonista de los receptores TRPV1 disminuye o suprime la contracciones involuntarias del detrusor en estos pacientes, quizás por una desensibilización de los nervios aferentes o de las células uroteliales que los contienen (Silva *et al.*, 2002), y que se acompaña del incremento en la expresión de estos receptores vanilloides (Birder *et al.*, 2010).

1.3. FISIOLÓGÍA DE LA ERECCIÓN PENEANA

El pene es el órgano masculino involucrado en una doble función urinaria y sexual. Esta última implica un cambio de su estado normal de flacidez a rigidez mediante el proceso de erección peneana. Este proceso es un evento neurovascular modulado por factores psicológicos y hormonales, cuya regulación es dependiente de complejas interacciones entre el sistema nervioso central, periférico y factores locales.

1.3.1. Anatomía e histología del pene

El pene es un órgano cilíndrico que pende sobre las bolsas escrotales, por debajo de la sínfisis pubiana, uniéndose a la región anterior del periné (Platas, 1997). Su tamaño y consistencia varía según si se halla en estado de flacidez o de erección (Chicharro y Parrilla, 2010).

El cuerpo del pene está formado por tres cilindros eréctiles: dos cuerpos cavernosos, situados dorsolateralmente, y un cuerpo esponjoso en la parte ventral que aloja a la uretra en su interior y que en la parte distal se dilata para formar el glande (Miller y Morgan, 1994).

Los cuerpos cavernosos constituyen la mayor parte del pene y se inician en las ramas isquiopubianas (Prost y Sharlip, 2006). Cada cuerpo cavernoso se encuentra envuelto por la túnica albugínea, formada por fibras elásticas y colágenas, uniéndose en la línea medial (septo intercavernoso), excepto en la zona más distal permitiendo el flujo de sangre entre las dos cámaras eréctiles (Miller y Morgan, 1994).

En el interior de los cuerpos cavernosos se encuentra el tejido eréctil, que consiste en una malla trabecular formada por haces de fibras musculares lisas, ICCs, fibroblastos, nervios, arterias y senos venosos revestidos por células endoteliales planas, simulando al corte una esponja, cuyos huecos forman los espacios lacunares. Los capilares sanguíneos rellenan estos huecos y están dotados de dispositivos musculares que permiten o cierran

el paso de la sangre a estos espacios. Cuando la sangre pasa los cuerpos cavernosos se hinchan y se endurecen (Chicharro y Parrilla, 2010). Posteriormente el flujo de sangre retorna a través de canales anastomosados que conectan el espacio lacunar con el cuerpo esponjoso y con el drenaje venoso (Breza *et al.*, 1989). Estudios con microscopía electrónica han demostrado la existencia de uniones intercelulares comunicantes en el músculo trabecular del cuerpo cavernoso humano, permitiendo a este órgano comportarse como un sincitio funcional coordinado (Christ *et al.*, 1991a).

El cuerpo esponjoso se fija bajo el músculo transverso profundo del periné, en un ensanchamiento denominado bulbo, recibiendo a partir de este punto a la uretra, y recubriéndose por el músculo bulbocavernoso. Una de las funciones del cuerpo esponjoso es la de prevenir la compresión de la uretra durante la erección (Chicharro y Parrilla, 2010).

Estos tres cilindros están revestidos por la fascia profunda o de Buck, que es una envoltura fibroelástica relacionada con los vasos y nervios profundos del pene (Wein *et al.*, 2007) y que continúa con la fascia superficial del escroto y el periné, donde encontramos los vasos y nervios superficiales del pene.

Los músculos isquiocavernosos y bulboesponjosos del periné, con sus conexiones con el elevador del ano, parecen ejercer una acción importante durante la erección, contrayéndose y comprimiendo los vasos sanguíneos de manera que impiden el retorno venoso y facilitan el llenado de la sangre y la erección (Chicharro y Parrilla, 2010).

Vascularización del pene

La vascularización peneana generalmente proviene de la arteria pudenda interna, rama de la arteria ilíaca interna, aunque en un pequeño porcentaje de varones puede provenir de la arteria obturatriz o isquiática (Platas, 1997).

La arteria pudenda interna recorre el conducto de Alcock saliendo de la pelvis por el agujero sacrociático mayor y penetrando por el agujero sacrociático menor dirigiéndose hacia el canal pudendo. Una vez allí pasa a denominarse arteria peneana común y se divide en sus ramas terminales: bulbouretral, dorsal y cavernosa o media del pene. Éstas últimas dan lugar a las arterias helicinas o cortas (arteria de Mueller) que se abren directamente a los espacios cavernosos sin formar capilares, cuya dilatación e ingurgitación provoca finalmente la erección del pene (Chicharro y Parrilla, 2010).

El drenaje venoso se divide en tres partes o sistemas: superficial, intermedio y profundo (Chicharro y Parrilla, 2010).

Inervación del pene

El tono muscular del pene está regulado tanto por el sistema nervioso central como por el periférico, además de por factores locales liberados por el endotelio. Los mecanismos centrales que controlan la respuesta eréctil incluyen vías espinales y supraespinales donde intervienen diversos neurotransmisores, ejerciendo un papel inhibitorio (encefalinas y 5-HT) o facilitatorio (dopamina, ACh, NO, oxitocina...). Las señales nerviosas periféricas viajan por tres grupos de nervios periféricos: parasimpáticos (pélvicos), simpáticos (hipogástricos) y somáticos (pudendos) (Andersson, 2000).

Los nervios que inervan el pene son ramas del nervio pudendo y del nervio cavernoso. El nervio pudendo es responsable de la inervación somática del pene (sensorial y motora), mientras que el cavernoso es una combinación de fibras simpáticas y parasimpáticas que constituyen la inervación autónoma del órgano (Breza *et al.*, 1989).

El nervio cavernoso está formado por fibras postganglionares de los plexos hipogástricos pélvicos y de las cadenas ganglionares para-vertebrales (los mismos que inervaban el tracto urinario inferior) (Chicharro y Parrilla, 2010) penetrando en los cuerpos cavernosos y esponjoso e inervando el tejido eréctil y las arterias helicinales (Priviero *et al.*, 2007).

Mientras que la estimulación del nervio hipogástrico o del tronco simpático causa detumescencia, la estimulación del plexo pélvico produce erección, indicando que los terminales simpáticos son los responsables de la flacidez del pene, y los parasimpáticos de la erección (El-Sakka y Lue, 2004). Los principales neurotransmisores postganglionares implicados son la NA (terminales simpáticos) y la ACh (terminales parasimpáticos) (Priviero *et al.*, 2007).

La vía somatosensorial se inicia en receptores de la piel, glándula, uretra y cuerpo cavernoso. El glándula humano presenta numerosas terminaciones aferentes que derivan de fibras mielínicas y fibras C no mielínicas, que convergen formando el nervio dorsal del pene y posteriormente el nervio pudendo, enviando al sistema nervioso central información relacionada con el dolor, la temperatura y el contacto (El-Sakka y Lue, 2004). Hay evidencias de que el nervio dorsal del pene está formado tanto por fibras somáticas como autónomas que regulan la erección y la eyaculación, así pues se han observado en este nervio haces de fibras inmunopositivas para NOS de origen autónomo en humanos (Burnett *et al.*, 1993) y en rata (Carrier *et al.*, 1995).

Los nervios somáticos también presentan función motora, así pues el nervio pudendo, que regula la función del rabdoesfínter, también manda fibras eferentes a los

músculos isquiocavernosos, bulbocavernosos y otros músculos estriados de la pelvis y periné, cuya contracción facilita el proceso de erección y de eyaculación (El-Sakka y Lue, 2004; Chicharro y Parrilla, 2010).

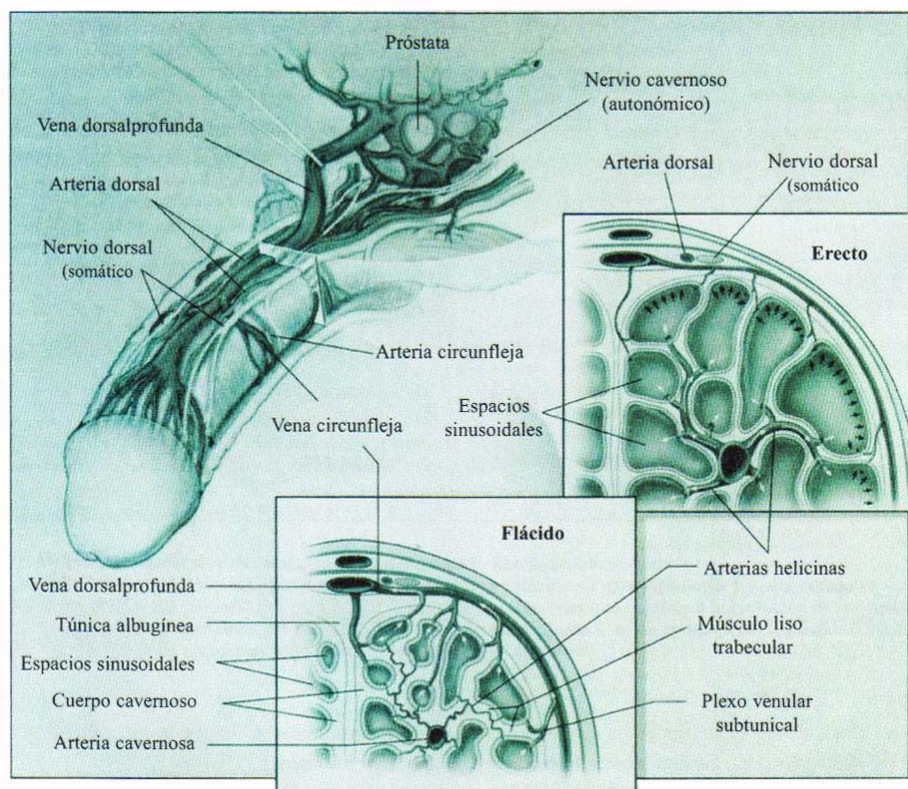


Figura VII. Anatomía del pene. Los nervios cavernosos (autónomos) que viajan posterolateralmente entran en el cuerpo cavernoso y cuerpo esponjoso para regular el flujo sanguíneo peneano durante la erección y la detumescencia. Los nervios dorsales (ramas de los pudendos) son responsables de la sensación peneana. En los cortes transversales observamos las diferentes estructuras del tejido erétil y su disposición en el estado flácido (flujo sanguíneo de entrada a los espacios lacunares mínimo por la contracción de las arterias y del músculo liso trabecular) y erétil (aumenta el flujo sanguíneo por la relajación del músculo liso trabecular y la vasodilatación de las arterias expandiéndose los espacios lacunares) (Lue, 2003).

1.3.2. Erección y detumescencia peneana

La mayoría del tiempo el pene se encuentra en un estado de flacidez o de detumescencia. Durante este periodo el músculo liso trabecular del cuerpo cavernoso y las arterias helicinas se encuentran tónicamente contraídos por tres factores: impulsos nerviosos eferentes simpáticos, actividad intrínseca miogénica del cuerpo cavernoso y sustancias vasoconstrictoras secretadas por el endotelio, tales como ET y $\text{PGF}_2\alpha$. Estos factores permiten que exista solo una pequeña cantidad de flujo arterial hacia los

espacios lacunares, no comprimiendo el plexo venoso subtúnica y permitiendo la salida del flujo sanguíneo (Lue, 2003).

La estimulación sexual activa la vía somatosensorial a partir de los receptores de contacto del pene y el glande, mandando información a la médula espinal donde se activan las vías eferentes que provocan la erección. Durante la erección psicogénica (resultado de estímulos audiovisuales o fantasías) impulsos del sistema nervioso central modulan los centros de la médula espinal que activan el proceso eréctil (Martínez-Salamanca *et al.*, 2010). Las vías eferentes que producen la erección inducen la liberación de neurotransmisores de los terminales parasimpáticos del nervio cavernoso que producen la relajación del músculo liso trabecular de los cuerpos cavernosos y la vasodilatación de las arterias y arteriolas que suplen el tejido eréctil. La relajación de estas estructuras produce un aumento del flujo sanguíneo hacia los espacios lacunares que los expande alargando y ensanchando el pene. Adicionalmente tanto la ACh liberada de los nervios como el propio aumento de flujo sanguíneo hacia los espacios lacunares inducen la liberación de factores relajantes endoteliales que ayudan a mantener el estado de relajación y erección penéana. Actualmente se cree que el principal neurotransmisor que media la relajación del pene es el NO, liberado tanto por los nervios nitrérgicos como por el endotelio (Andersson, 2000). La expansión de los sinusoides comprime el plexo venular subtúnica contra la túnica albugínea, que a su vez se estira y comprime adicionalmente a las venas emisarias, reduciendo así al mínimo el flujo sanguíneo de salida. Estos sucesos atrapan la sangre dentro del cuerpo cavernoso aumentando la presión intracavernosa hasta los 100 mmHg en la fase de erección completa (Lue, 2003).

Además, durante la masturbación o el coito se desencadena también el reflejo bulbocavernoso, en el que se activa la vía eferente del nervio pudendo que produce la contracción de los músculos isquiocavernosos y bulbocavernosos, comprimiendo fuertemente la base del cuerpo cavernoso llena de sangre y aumentando la presión intracavernosa hasta alcanzar varios cientos de milímetros de mercurio (fase de erección rígida). Durante esta fase la entrada y salida de fluido cesa temporalmente (Lue, 1988). La contracción rítmica de los músculos bulbocavernosos por otra parte es necesaria para la eyaculación.

La vuelta al estado de detumescencia es el resultado de diferentes factores: el cese de la liberación de neurotransmisores, la hidrólisis de nucleótidos cíclicos por PDE y la descarga simpática durante la eyaculación (Martínez-Salamanca, 2010). La contracción del músculo liso trabecular de los cuerpos cavernosos abre de nuevo los canales venosos, la sangre atrapada sale y el estado de flacidez retorna.

1.3.3. Regulación de la función eréctil

El estado funcional del pene (detumescencia o erección) viene determinado periférica y localmente por el balance entre los factores contráctiles y relajantes que controlan el grado de contracción del músculo liso del cuerpo cavernoso (Andersson, 2000).

1.3.3.1. Regulación nerviosa

- Neurotransmisión colinérgica

El tejido peneano está densamente innervado por fibras colinérgicas (Hedlund *et al.*, 2000), presentando receptores muscarínicos localizados en el músculo liso cavernoso y en el endotelio (Andersson, 2001a). Se han encontrado 4 subtipos de receptores muscarínicos (M₁-M₄) en el cuerpo cavernoso humano (Traish *et al.*, 1995a), de los cuáles el M₂ se ha sugerido que es el subtipo presente en el músculo liso (Toselli *et al.*, 1994; Traish *et al.*, 1995a), mientras que en el endotelio se encontraría fundamentalmente el M₃ (Traish *et al.*, 1995a).

Aunque se ha observado que la ACh relaja tanto el músculo liso trabecular como arterial del pene, los primeros estudios ya mostraron que la respuesta eréctil inducida por la estimulación del nervio pélvico o de los nervios cavernosos era atropina-resistente (Andersson y Wagner, 1995) y que la adición directa de carbacol a células musculares lisas de cuerpo cavernoso aisladas producía una respuesta contráctil (Andersson, 2001a). Estos datos indican que el efecto relajante de la ACh sobre el tejido eréctil no es un efecto directo, habiéndose postulado su acción a través de la inhibición presináptica de la liberación de NA y la disminución del tono simpático (Saenz de Tejada *et al.*, 2004).

Por otra parte, en preparaciones aisladas de cuerpo cavernoso desprovistas de endotelio, la ACh no produce ninguna relajación (Saenz de Tejada *et al.*, 1988), lo que demuestra que la ACh está facilitando la liberación de uno o más factores relajantes endoteliales que actúan directamente sobre el músculo liso cavernoso (Andersson y Wagner, 1995) entre los cuales se han identificado el NO y diversas PGs (Minhas *et al.*, 2001a).

- Neurotransmisión adrenérgica

Tanto los vasos peneanos como el músculo trabecular cavernoso reciben una densa innervación adrenérgica (Andersson, 2001a) responsable del estado de detumescencia mediante la liberación tónica de NA (Giuliano *et al.*, 1993). Ésta, actuando sobre receptores α -adrenérgicos de las arterias helicinas del pene y del músculo liso trabecular,

contrae ambas estructuras de manera que se reduce el flujo arterial y se colapsan los espacios lacunares (Andersson y Wagner, 1995). Aunque se ha demostrado la presencia receptores α_1 y α_2 (Andersson y Wagner, 1995; Traish *et al.*, 1995b, c, 1997; Goepel *et al.*, 1999), el papel preponderante corresponde al subtipo α_1 en la contracción muscular cavernosa (Andersson, 2001a) y probablemente también en la de los vasos peneanos (Simonsen *et al.*, 1997a, b). En cuanto a los subtipos involucrados en el cuerpo cavernoso humano se ha sugerido la participación del α_{1A} , α_{1B} , α_{1L} y α_{1D} (Traish *et al.*, 1995b; Davis *et al.*, 1999), mientras que en el perro y la rata se han hallado α_{1B} y α_{1L} fundamentalmente (Sironi *et al.*, 2000).

La contracción mediada por los receptores α -adrenérgicos parece que resulta tanto de la liberación de Ca^{2+} intracelular inducida por IP_3 como del influjo de Ca^{2+} a través de los canales de membrana tipo L (Andersson, 2001a). Actualmente se cree que también juega un papel importante (sobretudo en el mantenimiento de la contracción) la vía RhoA/ROCK aumentando la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} y favoreciendo la contracción sostenida durante la detumescencia (Mas, 2010). Además se ha postulado que la activación de esta vía suprime la expresión y la actividad de la eNOS, así como la fosforilación que permite su activación, inhibiendo la relajación endotelial (Bivalacqua *et al.*, 2004; Ming *et al.*, 2002), y manteniendo la contracción.

Los receptores α_2 se han detectado en nervios adrenérgicos inhibiendo la liberación de la NA por una parte e inhibiendo la liberación de NO por otra, tanto en cuerpo cavernoso como en vasos del pene (Molderings *et al.*, 1989; Simonsen *et al.*, 1997b; Saenz de Tejada *et al.*, 2000).

Aunque menos numerosos también se han descrito receptores β -adrenérgicos en músculo y vasos del cuerpo cavernoso (Adaikan y Ratnam, 1988; Simonsen *et al.*, 1997a), y sus agonistas producen relajación tanto en cuerpo cavernoso (Teixeira *et al.*, 2004) como en arterias peneanas (Andersson y Wagner, 1995), mediadas por aumentos de cAMP o por liberación de NO endotelial (Teixeira *et al.*, 2004).

- Neurotransmisión nitrérgica

Está ampliamente aceptado que el NO presenta un papel primordial en la relajación del músculo liso del cuerpo cavernoso y de sus vasos, así como que éste procede tanto del endotelio como de los nervios nitrérgicos que inervan el tejido eréctil (Andersson y Wagner, 1995).

Se ha demostrado la presencia de nNOS tanto en los nervios cavernosos y en sus terminales, como en los plexos nerviosos de las arterias cavernosas profundas (Andersson, 2001a). La colocalización de nNOS y VACHT sugiere el origen

parasimpático de los nervios nitrérgicos del tejido eréctil (Hedlund *et al.*, 2000). La estimulación eléctrica del plexo pélvico induce erección peneana, y ésta es revertida por inhibidores de la NOS (Burnett *et al.*, 1992), de forma similar a la relajación inducida por EFS *in vitro* en cuerpo cavernoso, que es abolida por inhibidores de la NOS y secuestradores de NO (Rajfer *et al.*, 1992; Argiolas y Melis, 1995). En arterias peneanas también se ha demostrado que la EFS produce vasodilatación mediada por NO de origen neural (Prieto, 2008).

La relajación del cuerpo cavernoso por NO está mediada por un aumento de cGMP, y la PKG I es el principal mediador de la vía NO/cGMP en este tejido (Andersson, 2001a). Se ha postulado que por una parte la PKG I fosforila diversas proteínas, incluyendo canales iónicos y bombas de membrana, y que causan la apertura de los canales de K⁺, el cierre de los de Ca²⁺, y el secuestro de Ca²⁺ por el retículo sarcoplásmico, disminuyendo su concentración y produciendo la relajación. También se ha sugerido que esta vía inhibe la actividad RhoA/ROCK, reduciendo la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca²⁺ y facilitando el mantenimiento de la relajación (Mas, 2010).

Especialmente relevante es el papel de las PDEs, en concreto la PDE5, en el retorno al estado de flacidez gracias a la inactivación de cGMP por hidrólisis (Lue, 2003). Inhibidores de PDEs, como es el Sildenafil (Viagra®), aumentan la relajación nitrérgica *in vitro* del cuerpo cavernoso y la presión intracavernosa en perros anestesiados, amplificando el efecto del NO mediado por cGMP, lo que ha llevado a su utilización en el tratamiento de la disfunción eréctil (Lue, 2003).

- Otros neurotransmisores

Entre los *neuropéptidos*, destaca el VIP, habiéndose observado la colocalización de VIP, nNOS y VACHT en cuerpo cavernoso (Dail, 1993), lo que sugiere su origen colinérgico (Andersson, 2001a). VIP provoca la relajación de cuerpo cavernoso y vasos peneanos (Argiolas y Melis, 1995) aumentando el cAMP sin alterar el cGMP (Hedlund *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1995). Sin embargo, su efecto *in vivo* no es concluyente, ya que su administración intracavernosa no tiene ningún efecto sobre la contractilidad del pene (Gratzke *et al.*, 2010). Aunque otros neuropéptidos (NPY, SP, CGRP o péptido histidina-metionina) han sido descritos en el cuerpo cavernoso, frecuentemente asociados a VIP, su relevancia funcional es muy cuestionada (Andersson, 2001a) a tenor de lo ambiguo o modesto de sus efectos directos (Argiolas y Melis, 1995).

La administración intracavernosa de ATP o adenosina en perro aumenta la presión intracavernosa del pene y la erección (Takahashi *et al.*, 1992a, b), y relajan el tejido eréctil del conejo (Tong *et al.*, 1992), sugiriendo la presencia de un componente purinérgico en el inicio y mantenimiento de la erección (Tong *et al.*, 1992) y que parece

estar mediado por receptores P2Y₂ y P2Y₁ a través de un mecanismo independiente de NO (Gur y Hellstrom, 2009).

Por último estudios recientes proponen un papel del sulfuro de hidrógeno (H₂S) dada la presencia de cistationina β-sintasa y cistationina γ-liasa, responsables de la producción de este gas, así como que donadores del mismo originan una relajación de las preparaciones cavernosas que es independiente del endotelio (Bianca *et al.*, 2007). Además, la contracción inducida por EFS es potenciada por inhibidores de cistationina β-sintasa y cistationina γ-liasa.

1.3.3.2. Papel del endotelio

En el cuerpo cavernoso está bien establecida la importancia funcional del endotelio en el proceso de erección (Bivalacqua *et al.*, 2000; Andersson 2001b). Tanto el endotelio vascular del cuerpo cavernoso como el de las arterias cavernosas son una fuente de agentes vasoactivos relajantes y contráctiles cuyo correcto balance es crítico para el buen funcionamiento del proceso de erección. Alteraciones en este equilibrio se han observado en numerosos casos de disfunción eréctil (Andersson, 2001b). Entre los agentes vasoactivos liberados por el endotelio cabe destacar el NO generado por la actividad eNOS tanto en los espacios lacunares como en las arterias helicinales (Andersson, 2001a), induciéndose su liberación tanto por agonistas (ACh) como por estímulos físicos, tales como el estrés mecánico generado por el flujo sanguíneo (Hedlund *et al.*, 2000). La relajación del cuerpo cavernoso inducida por la adición de carbachol o ACh es prevenida por inhibidores de la NOS (Argiolas y Melis, 1995; Minhas *et al.*, 2001a), sugiriéndose la implicación de receptores M₃ endoteliales, el aumento de Ca²⁺ intracelular y la activación de la eNOS (Lue, 2003). Por otro lado la activación de la eNOS por estrés mecánico parece involucrar la ruta fosfatidilinositol 3-quinasa-serina/treonina proteinkinasa Akt, que fosforila a eNOS reduciendo el requerimiento de Ca²⁺ para la producción de NO y facilitando el mantenimiento de la erección (Hurt *et al.*, 2002). Así pues se ha sugerido que la eNOS sería la responsable del mantenimiento del estado eréctil mientras que la isoforma nNOS mediaría la iniciación de la erección (Hurt *et al.*, 2002; Burnett, 2004).

Junto al NO, el endotelio del cuerpo cavernoso libera diversas PGs (PGE₂, PGI₂, PGE₁, PGF₂α, TXA₂, PGD₂; Minhas *et al.*, 2000a), cuya relevancia funcional parece estar relacionada con el tono del músculo liso trabecular. La inhibición de COX con indometacina en preparaciones de cuerpo cavernoso humano atenúa las respuestas relajantes inducidas por EFS, mientras que aumenta las contráctiles (Kimura *et al.*, 1990; Minhas *et al.*, 2001a). En humanos existe controversia a este respecto puesto que se ha postulado tanto una atenuación (Kimura *et al.*, 1990) como un incremento (Azadzo *et al.*, 1992) de la relajación tras la inhibición de la COX. Los datos obtenidos hasta el

momento parecen indicar que ciertas PGs serían liberadas durante el proceso de erección facilitando la relajación muscular, mientras que otras participarían en el proceso de detumescencia (Berridge, 2008). Esta hipótesis se basa en que mientras PGs como la PGE₁ y la PGE₂ originan respuestas relajantes activando receptores EP₂, EP_{3II} y EP₄ de las células musculares lisas con aumento en los niveles de cAMP (Pierce y Regan, 1998; Andersson, 2001a), otras como la PGF₂ α y TXA₂ inducen contracción muscular actuando sobre receptores PGH₂/TP y tromboxanos, respectivamente, los cuales activan la PLC, aumentando los niveles de Ca²⁺ intracelular (Minhas *et al.*, 2000a, 2001a; Andersson, 2001a). En el caso de la PGF₂ α se ha sugerido que también pudiera mediar la contracción por activación de la ROCK (Hashitani, 2006).

El estrés mecánico producido por el llenado de los espacios lacunares podría activar una liberación de PGE₂ dependiente de NO (Ballermann *et al.*, 1998), siendo un potente agente vasodilatador del cuerpo cavernoso humano (Bivalacqua *et al.*, 2003a). El hecho de que la administración intracavernosa de PGE₁ haya sido utilizada con éxito en tratamientos contra la impotencia (Gingell, 1998) pone de manifiesto su importancia funcional, aunque sus mecanismos de acción aún no han sido definidos. De hecho las PGs podrían tener además un efecto indirecto sobre el tono muscular modulando presinápticamente la liberación de NA (Minhas *et al.*, 2000a; Hashitani *et al.*, 2005), o provocando un aumento en la expresión y la actividad de las isoformas NOS constitutivas (Escrig *et al.*, 1999).

El endotelio es capaz de liberar otro factor, conocido como factor hiperpolarizante derivado del endotelio, tanto por agonistas como por estrés mecánico, cuyo efecto relajante tiene lugar por una reducción de Ca²⁺ intracelular (Busse *et al.*, 2002) por un mecanismo independiente de NOS y COX (Angulo *et al.*, 2003).

Más relevante parece el papel de la ET, sobretudo en el mantenimiento del estado de flacidez (Andersson y Wagner, 1995). La ET-1, cuya presencia ha sido demostrada en los sinusoides y músculo del cuerpo cavernoso humano (Saenz de Tejada *et al.*, 1991), induce una contracción potente y sostenida de cuerpo cavernoso y vasos peneanos (Andersson y Wagner, 1995; Becker *et al.*, 2000) mediada a través de receptores ET_A y ET_B (Bivalacqua *et al.*, 2003a). Sin embargo, el papel funcional de las ET parece estar limitado a ciertos procesos patofisiológicos, como la diabetes, donde su expresión se ve modificada (Becker *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2003).

Por último, la generación de ROS por parte del endotelio está recibiendo una atención creciente (Mas, 2009). La producción de ROS suele comenzar con la generación de $\cdot\text{O}_2^-$, por parte de la enzima NADH fosfato oxidasa, que posteriormente es metabolizado a H₂O₂ por la acción de superóxido dismutasas. Los ROS incrementan la actividad eNOS

tanto por aumentos de Ca^{2+} intracelular como por fosforilación Akt-dependiente (Cai *et al.*, 2003). Sin embargo, un exceso de O_2^- puede oxidar moléculas como el propio NO, generando otras especies reactivas muy oxidantes como el peroxinitrito, el cual produce el desacoplamiento de la eNOS (Mas, 2009) disminuyendo la síntesis de NO.

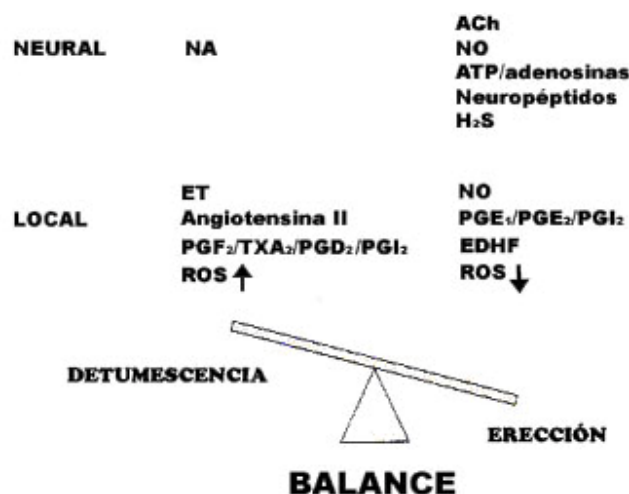


Figura VIII. El balance entre los agentes contráctiles y relajantes determinará el tono muscular del cuerpo cavernoso: detumescencia o erección.

1.3.3.3. Las células intersticiales de Cajal en el cuerpo cavernoso

El cuerpo cavernoso permanece en un estado de detumescencia hasta la llegada del impulso parasimpático. Este estado es mantenido por una contracción tónica del músculo liso, dependiente fundamentalmente de la liberación basal de NA, pero que también podría ser facilitada por la actividad espontánea asociada con la formación de ondas lentas (Fovaeus *et al.*, 1987; Christ *et al.*, 1990; Andersson y Wagner, 1995). Dicha actividad miógena podría originarse en ICCs actuando como marcapasos, de forma similar a lo descrito en intestino y uretra. Esta sugerencia está sustentada en la existencia de una red de ICCs descrita en el cuerpo cavernoso proximal al músculo liso trabecular (Hashitani y Suzuki, 2004; Shafik, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las células musculares lisas aisladas del cuerpo cavernoso también son capaces de generar actividad eléctrica espontánea (Montgomery y Fry, 1992; Karkanis *et al.*, 2003), por lo que, al igual que en la vejiga, la función de las ICCs podría limitarse a modular la señal generada en los miocitos (Hashitani *et al.*, 2005).

A pesar de haberse demostrado la presencia de ICCs en el cuerpo cavernoso humano y de otros mamíferos pocos son los estudios que se han centrado en investigar su posible papel fisiológico en este órgano. Una mayor investigación en este campo es necesaria

para esclarecer su participación en la actividad espontánea del tejido o en la neurotransmisión excitatoria o inhibitoria del mismo.

1.4. DISFUNCIÓN ERÉCTIL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD

La disfunción eréctil (ED), definida como la incapacidad de conseguir o mantener una erección suficiente como para completar el acto sexual (Tostes *et al.*, 2008), afecta a más de 150 millones de hombres en el mundo, cifra que se estima se doblará en el año 2025 (Ayta *et al.*, 1999).

Factores emocionales, físicos y médicos pueden contribuir a la ED, así como puede ser síntoma también de varias enfermedades crónicas, como la hipertensión, la diabetes o la aterosclerosis (Sampson *et al.*, 2007). Asimismo puede estar relacionada con otros factores orgánicos como el tabaquismo o la obesidad, o psicogénicos como la depresión o la ansiedad (Priviero *et al.*, 2007). Son muchas las causas que pueden estar relacionadas con esta enfermedad, y en base a ellas se ha clasificado a la ED como psicogénica, vascular, neurológica u hormonal (Andersson, 2001a). Aunque es difícil discernir entre factores psicogénicos y orgánicos, se ha reconocido a la ED vascular como la predominante, presentándose en el 75% de los casos (National Institutes of Health Consensus Statement, 1993), y estando relacionada con una mala perfusión vascular de los cuerpos cavernosos.

Uno de los principales factores de riesgo para la ED es la edad avanzada, ya que esta disfunción es particularmente común en hombres mayores de 50 años (Seftel, 2003), con un porcentaje de afectación del 55% en hombres de 75 (Kaiser, 1991; Johannes *et al.*, 2000; Feldman *et al.*, 2000). Aunque el envejecimiento está asociado también a otras enfermedades relacionadas con la ED, ésta es frecuente en hombres de edad avanzada que no sufren de otra enfermedad sistémica (Dahiya *et al.*, 1997). Con el envejecimiento se produce un aumento en el periodo de latencia entre la estimulación sexual y la erección, erecciones menos rígidas, eyaculaciones menos enérgicas y de menor volumen, y un periodo refractario entre las erecciones más largo (Lue, 2003).

La integridad de la estructura de los cuerpos cavernosos y de sus vasos es crucial para la regulación del tono muscular y para la erección, de modo que su alteración con el envejecimiento podría tener un impacto en el estado hemodinámico del pene. De hecho, en el cuerpo cavernoso humano y de rata se ha descrito una disminución progresiva de la masa muscular con la edad (Wespes, 2000; Bakircioglu *et al.*, 2001; Costa y Vendeira, 2008; Ferrer *et al.*, 2010). En casos de impotencia también se ha sugerido la existencia de un aumento de la matriz intersticial de las trabéculas musculares (Jevtich *et al.*, 1990). En ratas envejecidas hay un aumento de las fibras colágenas y una disminución

de las elásticas (Calabrò *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001), produciendo una reducción de la elasticidad peneana, una disfunción veno-oclusiva del cuerpo cavernoso y ED (Wespes *et al.*, 1997). A ello habría que añadir la disminución del área de músculo liso y un aumento del calibre de los espacios lacunares con la edad que podrían estar involucrados en la ED asociada al envejecimiento (Costa y Vendeira, 2008).

Las modificaciones en la densidad de innervación parecen estar limitadas a la innervación nitrérgica, cuya disminución en el cuerpo cavernoso de la rata (Carrier *et al.*, 1997) estaría relacionada con una reducción de la respuesta eréctil inducida tanto por estimulación central como periférica. De hecho se ha descrito reducción tanto en la actividad NOS (Garban *et al.*, 1995) como en la expresión de su mRNA (Dahiya *et al.*, 1997), y como consecuencia una síntesis de NO insuficiente.

Recientemente, se ha descrito un aumento en la actividad arginasa del cuerpo cavernoso en conejo (Numao *et al.*, 2007) indicando una menor biodisponibilidad de L-arginina por competición de sustrato con nNOS y eNOS, con la consiguiente disminución de NO (Bivalacqua *et al.*, 2007).

Pese a que la relajación inducida por ACh esté atenuada en conejos y ratones envejecidos (Haas *et al.*, 1998; Bivalacqua *et al.*, 2007), los niveles de eNOS se encuentran elevados por lo que se postula una reducción en la expresión de la caveolina-1 y/o incrementos de ROS que provoquen el desacoplamiento de la eNOS (Bakircioglu *et al.*, 2001; Bivalacqua *et al.*, 2003a). Este hecho podría verse reforzado por un déficit de tetrahidrobiopterina, un cofactor imprescindible para el mantenimiento de la forma dimérica activa (Johnson *et al.*, 2011).

El estrés oxidativo es crecientemente considerado como uno de los principales factores que contribuyen a una disfunción vascular generalizada en la vejez (Hamilton *et al.*, 2001; Taddei *et al.*, 2001). La elevación de los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ en el sistema cardiovascular también se ha observado en las células endoteliales y musculares cavernosas de la rata envejecida sin modificaciones en los niveles de superóxido dismutasa, sugiriendo un desequilibrio en la generación de este anión y su inactivación (Bivalacqua *et al.*, 2003b). El $\cdot\text{O}_2^-$ reacciona con el NO formando peroxinitrito y disminuyendo los niveles de NO disponibles para la vasodilatación y la erección, a lo que habría que añadir el efecto degenerativo directo del peroxinitrito sobre los nervios y células endoteliales (Ferrini *et al.*, 2001; Bivalacqua *et al.*, 2003b).

El aumento en la actividad RhoA/ROCK (sin aumento de expresión) con la edad parece estar ligado a la menor biodisponibilidad de NO descrita (Jin *et al.*, 2006) como parece confirmar la mejoría en la función eréctil tras administración de inhibidores de la

ROCK (Rajasekaran *et al.*, 2005). A ello habría que añadir que una mayor inhibición por parte de ROCK de la fosforilación akt dependiente de eNOS reduciría aun más los niveles de NO (Musicki *et al.*, 2005).

Se ha postulado por otro lado que la disfunción endotelial vascular asociada a diabetes, hipertensión o envejecimiento podría estar relacionada con una sobreproducción de agentes contráctiles por parte del endotelio, probablemente prostanoïdes, que interferirían en la liberación o acción de los agentes relajantes (Minhas *et al.*, 2000a; Diederich *et al.*, 1990; Koga *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 2009). Así pues se ha observado en vasos de conejos y ratas diabéticas que la inhibición de la COX con indometacina restaura las relajaciones endoteliales colinérgicas que se encontraban alteradas (Minhas *et al.*, 2001b), y en hombres diabéticos con hipersensibilidad a tromboxanos el bloqueo de los receptores de estos prostanoïdes mejora la relajación endotelial colinérgica (Angulo *et al.*, 2006).

Por otra parte, algunos estudios sugieren la aparición de una hipersensibilidad a mediadores purinérgicos (ATP y adenosina) durante el envejecimiento como mecanismo de relajación compensatorio independiente de NO (Ragazzi *et al.*, 1996; Gur y Ozturk, 2000), en tanto que otros grupos describen una disminución de la relajación inducida por ATP en ratas diabéticas acompañada de una reducción de receptores P2Y₂ (Suadicani *et al.*, 2009). Una atenuación similar de la relajación se ha descrito en pacientes aquejados de ED junto a la presencia en el endotelio de receptores A_{2B} disfuncionales (Faria *et al.*, 2006).

Cabe mencionar finalmente que la presencia de LUTS parece ser el principal factor de riesgo para la aparición de ED durante el envejecimiento (Martín-Morales *et al.*, 2001), así como de otras disfunciones sexuales (Lukacs *et al.*, 1996; Frankel *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 2003), compartiendo modificaciones tales como una disminución en la vía NO/cGMP, aumento de la actividad simpática o incrementos en la activación de la ROCK (McVary, 2006). De hecho, diversos estudios clínicos ponen de manifiesto que la eficiencia del tratamiento con inhibidores de la PDE5 no se limita a la ED sino que mejora significativamente los LUTS (Mouli y McVary, 2009).

II. OBJETIVOS

A pesar de que las disfunciones del tracto urinario inferior y la disfunción eréctil son patologías particularmente comunes en personas de edad avanzada, su etiopatogenia continúa siendo un gran interrogante y no se dispone en la actualidad de tratamientos eficaces. Este hecho justifica la necesidad de avanzar en el estudio de las modificaciones inducidas por el envejecimiento en el tracto urinario inferior y el cuerpo cavernoso.

El principal objetivo de este estudio por tanto es analizar los cambios inducidos por el envejecimiento en la funcionalidad del músculo liso del tracto urinario inferior y del cuerpo cavernoso y en la regulación de la misma. Para ello se utilizará como modelo experimental la estirpe de ratones SAM-P8 (*senescence accelerated mouse prone*) la cual desarrolla espontáneamente un envejecimiento prematuro. Se emplearán sistemas de registro de la actividad contráctil en los que se analizarán las respuestas funcionales inducidas por EFS de las terminaciones nerviosas intramurales, y mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos se caracterizará la participación de cada uno de los sistemas de neurotransmisores implicados en las respuestas motoras. Dichos estudios funcionales se completarán con un análisis estructural, mediante técnicas inmunohistoquímicas, que nos permitirá caracterizar y cuantificar tanto las redes nerviosas intrínsecas como la presencia de células moduladoras de dichas respuestas funcionales.

Los objetivos concretos de este estudio se pueden resumir en los siguientes puntos, aplicables tanto a la vejiga urinaria, como a la uretra y al cuerpo cavernoso del pene:

1- Analizar los cambios producidos por el envejecimiento en las respuestas tanto contráctiles como relajantes inducidas por EFS, determinando los neurotransmisores implicados y sus mecanismos de acción. Comprende el análisis de las respuestas adrenérgicas, colinérgicas, purinérgicas y nitrérgicas fundamentalmente.

2- Comparar las respuestas neurogénicas, inducidas por estimulación nerviosa, con las provocadas por la adición exógena del neurotransmisor correspondiente y analizar los cambios producidos por el envejecimiento en su mecanismo de acción. Incluye el estudio de las respuestas inducidas por NA, ACh, ATP y donantes de NO fundamentalmente.

3- Analizar las variaciones en la densidad y distribución de la innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica inducidas por el envejecimiento, así como los cambios en la densidad y distribución de ICCs, mediante técnicas de inmunofluorescencia. Se hará especial hincapié en la posible participación de estas células como mediadores de la neurotransmisión nitrérgica, midiendo su capacidad de acumulación funcional de cGMP.

4- Analizar los cambios inducidos por el envejecimiento en las respuestas mediadas por el endotelio de los espacios cavernosos del pene, los mediadores implicados y los cambios en su mecanismo de acción.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material biológico

Se ha empleado la estirpe de ratones SAM-P8 (Senescent Accelerated Mouse Prone o ratones proclives a un envejecimiento prematuro) cuya esperanza de vida se reduce a 10-14 meses (frente a 24-30 meses de los ratones normales) y que constituye un modelo válido y óptimo para el estudio del envejecimiento (Takeda *et al.*, 1981; Yagi *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000b; Ueno *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 2004; Forman *et al.*, 2011). La estirpe de ratones SAM-R1 (Senescent Accelerated Mouse Resistant o ratones resistentes al envejecimiento prematuro) se ha utilizado como control interno de los ratones SAM-P8. Progenitores de ambas estirpes fueron generosamente cedidos por el profesor J. A. F. Tresguerres, catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y fueron mantenidos en el animalario de dicha Facultad.

Los animales fueron tratados en todo momento con arreglo a la Normativa Europea de manejo de animales de experimentación (Council Directive 86/609/EEC), habiendo sido aprobados todos los protocolos experimentales utilizados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

3.1.2. Material de laboratorio

3.1.2.1. Soluciones

a) Solución Krebs normal (mM): NaCl: 119, NaHCO₃: 15, MgCl₂: 1,2, Na₂PO₄ · H₂O: 1,2, CaCl₂: 1, glucosa: 11 y ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA): 0,015. Todos los reactivos fueron de Panreac (España) excepto EDTA que se obtuvo de Sigma-Aldrich (USA).

Antes de la adición de CaCl₂, la solución fue aireada durante 20 min con 95% O₂ y 5% CO₂. Una vez preparada dicha solución, se ajustó su pH a 7,4.

b) Solución Krebs rica en K⁺ (mM): Igual en composición a la solución Krebs normal en la cual se ha sustituido el NaCl por 119 mM de KCl (Panreac, España).

c) Solución Krebs libre de Ca²⁺ (mM): Igual en composición a la solución Krebs normal en la cual se ha eliminado el CaCl₂ y se ha sustituido por 0,032 mM de ácido etilen-glicol-bis (β-aminoetil eter) N, N, N', N' - tetraacético (EGTA, Sigma, USA).

d) Buffer fosfato (PB) 0,1 M; pH 7,4 (g/l): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Panreac, España): 13,79, y Na_2HPO_4 (Probus): 14,19.

3.1.2.2. Sustancias, reactivos y otros productos

Estudio funcional in vitro: Acetilcolina (ACh), Adenosina 5'-trifosfato disodio salt (ATP), 8-Arginina-Vasopresina acetato salt (AVP), Atropina sulfato, D-tubocurarina hidrocloreto, Fentolamina hidrocloreto, Guanetidina monosulfato, Isobutil-metil-xantina (IBMX), Ácido 1-(p-clorobenzol)-5-metoxi-2-metilindol-3-acético (Indometacina), α,β -Metilenadenosina 5'-trifosfato litio salt ($\alpha\beta$ -Metilen-ATP), N^G -nitro-L-arginina (L-NOARG), Noradrenalina bitartrato (NA) y 1,4-Dihidro-5-(2-propoxi-fenil)-7H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidina (Zaprinast) fueron adquiridos a Sigma Aldrich, Alemania. 2-N,N-Dietilamino-diazenolato-2-óxido Dietilamonio salt (DEA/NO) y 1H-(1,2,4)-oxadiazolo [4,3] alquinoxalin-1-one (ODQ) fueron adquiridos a Alexis Biochemicals, Suiza. Citrato de sildenafil fue cedido por Pfizer, España.

Todas las sustancias fueron diluidas en agua destilada, excepto IBMX y zaprinast que se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO), ODQ en acetonitrilo, DEA/NO en NaOH (0,01 M) e indometacina en etanol. Se realizaron alícuotas que se almacenaron a -20°C y cuando fueron necesarias se diluyeron a la concentración de trabajo en 0,9% NaCl.

Estudio histológico e inmunohistoquímico:

▪ Anticuerpos

Anticuerpos primarios: anti-VACHT policlonal de cabra (Abcam, UK), anti-nNOS policlonal de conejo (Cayman Chemical, MI, USA), anti-eNOS policlonal de conejo (Cayman Chemical, MI, USA), anti-vimentina policlonal de conejo (Abcam, UK), anti-GMP cíclico policlonal de oveja (cedido por el profesor J De Vente de la Universidad de Maastrich, Holanda), anti-tirosina hidroxilasa policlonal de oveja (Abcam, UK).

Anticuerpos secundarios: suero de asno anti-cabra conjugado con Alexa Fluor 484; suero de asno anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 596 y suero de asno anti-oveja conjugado con Alexa Fluor 484, todos ellos adquiridos a Chemicon (USA).

▪ Otros reactivos: Alcohol etílico 50°, 70°, 90°, 96°, 100° (Panreac, España), anestésico Rompun® con Xilacina 2% (Bayer, Alemania), anestésico Imalgene® 1000 con Ketamina 10% (Merial, Francia), colorante de Eosina (Panreac, España), colorante de Hematoxilina de Gill II (Panreac, España), heparina sal de sodio de mucosa intestinal porcina (Sigma-Aldrich, Alemania), hidróxido sódico (NaOH, Panreac, España), medio

de montaje para histoquímica DePex (Serva, Alemania), medio de montaje para inmunohistoquímica de fluorescencia Prolong[®] Gold antifade reagent (Molecular Probes, USA), Isopentano (Panreac, España), Nitrógeno líquido (Air liquid), paraformaldehído (Panreac, España), sacarosa (Panreac, España), Sylgard[®] 184 silicona (Dow Corning Corporation, USA), suero normal de asno (NSD, Chemicon, USA), OCT compound Tissue-teck[®] (Sakura, Holanda), Triton X-100 (TX-100, Sigma-Aldrich), Xilol (Panreac, España).

3.1.2.3. Programas informáticos

- Adobe Photoshop CS. Versión 8.0.1., Chart 5. Versión 5.5.1 para Macintosh y para Windows (AD Instruments), MetaMorph SPOT 6.1. y 7.0., GraphPad Prism Versión 5.0.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Estudios de frecuencia miccional

Previamente al sacrificio de los animales se determinó el patrón miccional, de acuerdo al procedimiento descrito por Dickson *et al.* (2006). Para ello se retiró el agua a los animales una hora antes de estos ensayos y se les colocó en una jaula individual con un lecho de papel de filtro durante una hora. Se contabilizaron el número de micciones totales y el número de micciones de pequeño tamaño (huella de diámetro inferior a 0,5 cm). La iluminación con una lámpara ultravioleta facilitó la visualización de las manchas de orina. Un aumento en el número total de micciones y especialmente en el número de micciones de pequeño tamaño es indicativo de la aparición de urgencia urinaria.

3.2.2. Estudios funcionales *in vitro*

3.2.2.1. Disección y preparación del tejido

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y pesados en una balanza de precisión, inmediatamente después de lo cual, se procedió a la apertura del abdomen mediante un corte a lo largo de la línea alba. Una vez localizada la vejiga urinaria, se accedió a la uretra mediante la sección de los huesos pélvicos, y se extrajo el conjunto vejiga-uretra (o vejiga-uretra-pene en el caso de los machos) separándolo de los uréteres y del tejido adiposo adyacente. El tejido fue rápidamente introducido en solución Krebs a 4°C.

Una vez extraído, y con la ayuda de una lupa binocular, se eliminaron los restos de grasa y tejido conectivo circundante. Después se realizó un corte transversal a nivel del cuello vesical con el objetivo de separar la vejiga de la uretra en las hembras, y del pene en el caso de los machos. Las tres estructuras fueron pesadas por separado.

Posteriormente la vejiga se abrió mediante un corte longitudinal en su cara ventral y se cortaron longitudinalmente tiras de músculo liso de la zona lateral y dorsal del detrusor, de aproximadamente 3 mm de longitud. La uretra se abrió longitudinalmente eliminando el EUE (distal) consiguiendo una tira muscular de entre 3 y 4 mm. Para preservar la integridad de la pared no se retiró la mucosa en ninguna de estas dos preparaciones. En el pene se eliminó la uretra y las venas dorsales y se separaron ambos cuerpos cavernosos mediante un corte longitudinal en la túnica albugínea, constituyendo cada uno de ellos una tira longitudinal muscular de aproximadamente 3 mm. Todas las preparaciones fueron anudadas en ambos extremos con seda (6/0), dejando un ojal en cada uno de ellos.

3.2.2.2. Registro de la actividad contráctil

Las preparaciones fueron sumergidas en baños de órganos horizontales de 5 ml conteniendo solución Krebs a 37°C, aireada con carbógeno (5% O₂ y 95% CO₂) a pH 7,4.

Las tiras longitudinales de músculo fueron fijadas a unos ganchos horizontales unidos a un transductor de fuerza isométrico (GRASS FT03, Quincy, MA, USA) que capta las variaciones de tensión, y a un tornillo micrométrico, que permite ajustar la tensión basal de las preparaciones.

Las variaciones de tensión fueron registradas en un ordenador Macintosh mediante un convertidor analógico/digital McLab v.5.5.1 (Hastings, East Sussex, UK), utilizando el programa informático Chart 5. Versión 5.5.1.

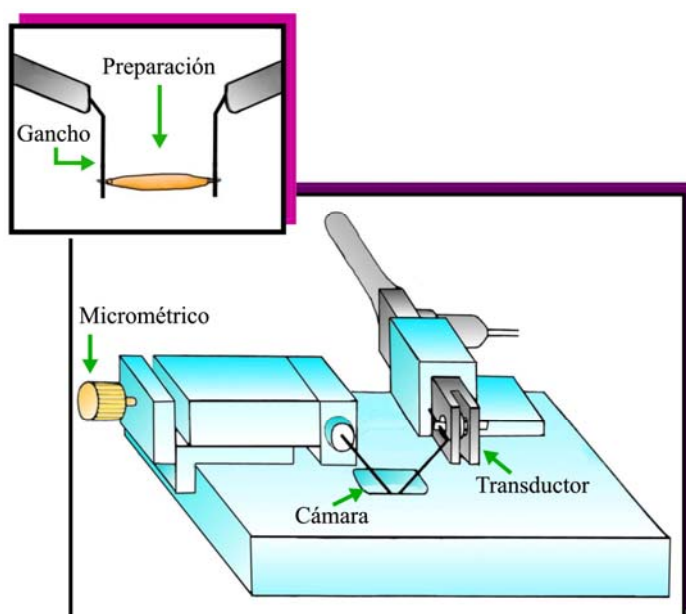


Figura IX. Esquema de un baño de órganos. En la parte superior izquierda se muestra el montaje de una preparación.

3.2.2.3. Determinación de la tensión óptima (L_0)

La determinación de la longitud óptima (L_0) a la que debían ser sometidas las preparaciones para obtener la máxima respuesta contráctil se realizó determinando la contracción inducida por una alta concentración de K^+ (120 mM) a diferentes niveles de estiramiento (**Fig. X**). La exposición a una alta concentración de K^+ extracelular provoca una estimulación muscular directa debida a la despolarización del músculo y la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Se evaluó la contracción activa generada por sucesivas adiciones de KCl (120 mM) a niveles progresivamente crecientes de estiramiento, relajando totalmente la preparación antes de cada aumento de longitud mediante la adición de una solución Krebs libre de Ca^{2+} . Tras obtener las curvas de tensión activa y pasiva se determinó el valor óptimo de tensión pasiva para cada una de ellas. Este valor óptimo de tensión pasiva es aquel al que se produce la máxima tensión activa. Este valor fue (en preparaciones de 3 mm de longitud) de $4,0 \pm 0,77$ mN ($n=7$) en las tiras de vejiga de hembras, $6,9 \pm 0,12$ mN ($n=7$) en las tiras vesicales de los machos, $1,73 \pm 0,53$ mN ($n=7$) en las tiras de uretra y $3,41 \pm 0,10$ mN ($n=7$) en las de cuerpo cavernoso.

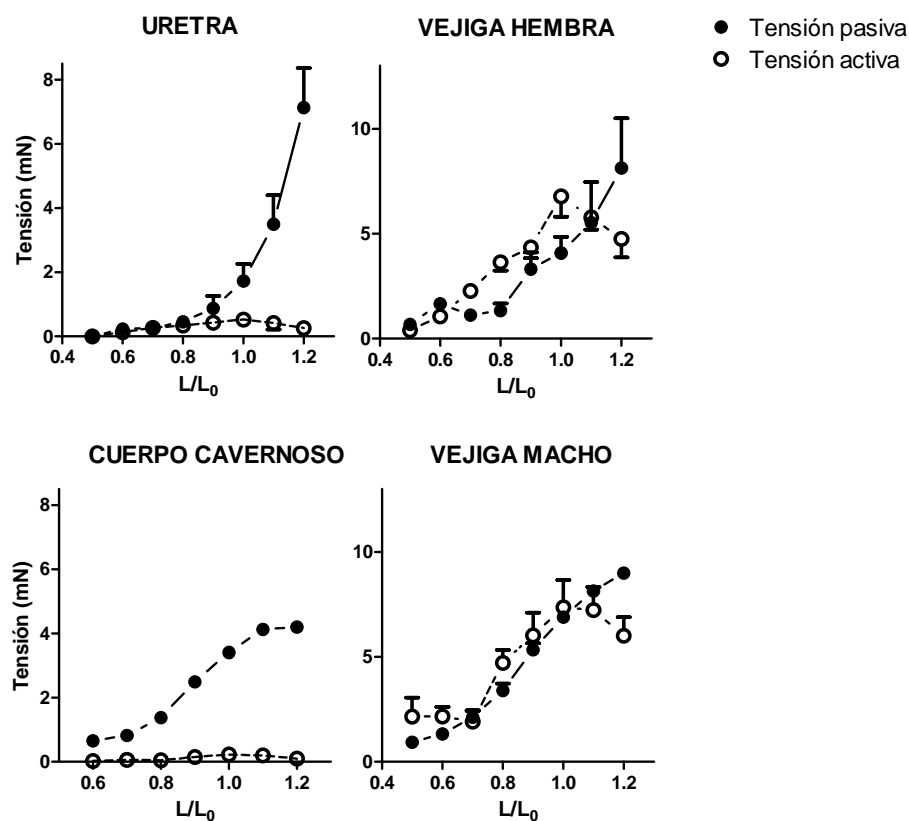


Figura X. Curvas longitud-tensión inducidas por la adición de una alta concentración de K^+ (120 mM) a niveles crecientes de estiramiento en preparaciones longitudinales (3 mm) de músculo liso de uretra, vejiga y cuerpo cavernoso SAM-R1. El valor óptimo de tensión pasiva es aquel en el que se consigue el máximo valor de tensión activa. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 7$).

Una vez aplicada la tensión inicial óptima en cada preparación, se dejó un tiempo de estabilización de aproximadamente 60 minutos. Pasado este tiempo, fueron contraídas dos veces seguidas mediante la administración de solución Krebs rica en K^+ (120 mM), con el fin de comprobar la viabilidad de las preparaciones.

En todos los ensayos detallados a continuación se renovó la solución Krebs cada 30 min a lo largo de todo el experimento.

3.2.2.4. Estimulación eléctrica transmural (EFS)

La estimulación eléctrica de campo se realizó mediante dos electrodos de platino situados paralelamente a la preparación y conectados a un estimulador (GRASS S-48, Quincy, MA, USA) acoplado a un amplificador de impulsos (Med-Lab stimulus splitter, Loveland, CO), que además permite mantener la intensidad del estímulo constante con

independencia de los cambios en la resistencia eléctrica periférica. Se administraron pulsos de onda cuadrada de 0,8 ms de duración y voltaje supramáximo (200 mA), agrupados en trenes de duración de 5 s y frecuencia variable entre 1 y 50 Hz cada 2 min. Estos parámetros eléctricos permiten la estimulación selectiva de las terminaciones intramurales provocando la liberación de los neurotransmisores contenidos en las mismas.

3.2.2.5. Protocolo experimental

El estudio de las respuestas contráctiles inducidas por EFS se llevó a cabo en preparaciones con tensión basal. En la uretra, estos estudios se realizaron en presencia de un inhibidor de la NOS (L-NOARG; 0,1 mM) para reducir el posible efecto de la liberación de NO, y con d-tubocurarina (0,1 μ M), antagonista de receptores nicotínicos, para evitar la estimulación de los nervios somáticos que inervan las fibras estriadas presentes en esta preparación.

Las respuestas relajantes inducidas por EFS se analizaron en preparaciones precontraídas con NA (50 μ M) en el caso del cuerpo cavernoso o AVP (0,1 μ M) en el caso de la uretra, por ser las que producían contracciones más estables y reproducibles en estas preparaciones. Además, las preparaciones fueron incubadas con guanetidina (50 μ M), que origina el vaciamiento de las vesículas sinápticas conteniendo NA y con atropina (1 μ M), bloqueante muscarínico, con objeto de reducir la liberación de NA de los nervios adrenérgicos y bloquear la acción de la ACh liberada sobre sus receptores, respectivamente.

La incubación previa (durante 30 minutos) con diferentes sustancias permitió su uso como herramientas farmacológicas para analizar la contribución relativa de los diversos neurotransmisores en las respuestas inducidas por EFS, tanto contráctiles como relajantes. Así, se han empleado: fentolamina (antagonista de receptores adrenérgicos), atropina (antagonista de receptores muscarínicos), $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (análogo del ATP que provoca la desensibilización de los receptores purinérgicos), L-NOARG (inhibidor no selectivo de la NOS) o indometacina (inhibidor de la COX).

El efecto directo de los diversos neurotransmisores o mediadores sobre el músculo liso se analizó añadiendo distintos agonistas directamente al baño de órganos a concentraciones crecientes, realizando curvas dosis-respuesta de contracción o de relajación según el caso. Se utilizó ACh y ATP en la vejiga, y NA y DEA/NO (como donante de NO) en la uretra y cuerpo cavernoso. También se estudió el efecto de IBMX, zaprinast o Sildenafil (inhibidores de las PDEs de cGMP) en las preparaciones uretrales y de cuerpo cavernoso. El tratamiento con un inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ) permitió analizar la participación de esta enzima en las respuestas inducidas por

DEA/NO y de Sildenafil. Las respuestas contráctiles (ACh, ATP, NA) se estudiaron añadiendo el agonista a las preparaciones en línea base, mientras que las respuestas relajantes (DEA/NO, Sildenafil, IBMX o zaprinast) se analizaron en preparaciones precontraídas con AVP en la uretra o NA en el cuerpo cavernoso.

En el cuerpo cavernoso se analizó además la relajación de origen endotelial inducida por la adición de ACh a concentraciones crecientes. El tratamiento durante 30 minutos con atropina (1 μ M), L-NOARG (0,1 mM), indometacina (30 μ M) y/o fentolamina (10 μ M) permitió determinar los mediadores implicados en dicha relajación. En este caso, las preparaciones fueron precontraídas con AVP, en lugar de NA, cuando se quería analizar la participación de receptores adrenérgicos en dicho proceso.

En todos los experimentos se llevaron a cabo controles paralelos con preparaciones no tratadas que fueron sometidos a los mismos protocolos experimentales, incluido el efecto de la adición de los solventes utilizados en la disolución de las distintas sustancias.

3.2.3 Estudios morfológicos

3.2.3.1. Obtención y tratamiento de las muestras

Anestesia. Los animales fueron anestesiados mediante la inyección intraperitoneal de una mezcla anestésica de 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina.

Perfusión. La fijación de los tejidos se llevó a cabo por perfusión cardíaca (exceptuando el caso de las preparaciones utilizadas para la visualización del GMPc). Para ello se realizó una incisión a lo largo de la línea alba y la apertura de la caja torácica. A continuación se punzó con un catéter el ventrículo izquierdo, sujetándolo con una pinza, para introducir las soluciones correspondientes, y se practicó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de las mismas tras recorrer la circulación mayor. Antes de introducir el fijador se eliminó previamente la sangre con una solución de lavado oxigenada, empleando PB con 5,58 mg/L de heparina como anticoagulante. A continuación se deja circular la solución fijadora, empleándose paraformaldehído al 4 % en PB. La presión de perfusión se mantiene a un valor próximo a la presión arterial media controlando la altura de la columna de líquido (120 cm de agua).

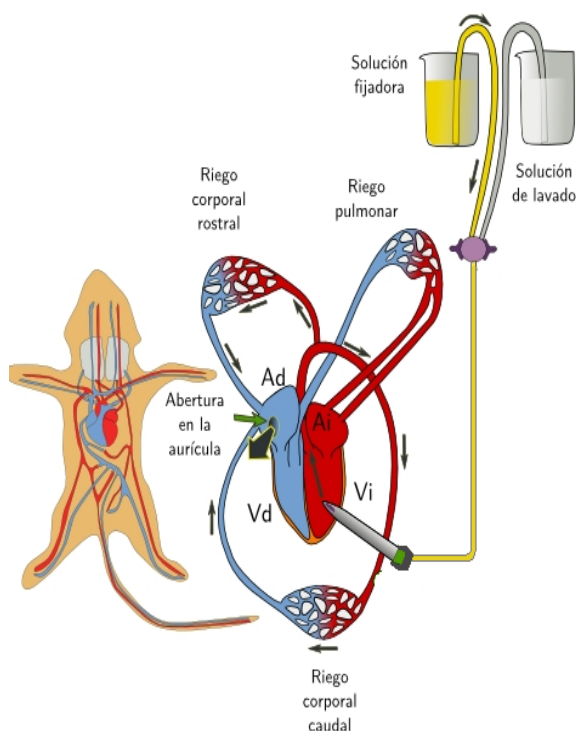


Figura XI. Esquema de la fijación por perfusión. Se introduce la solución fijadora en el sistema circulatorio a través del ventrículo izquierdo (Vi) desde el cual pasa a la aorta y se distribuye por todo el organismo a través de la circulación mayor. Tras pasar por la red capilar, la solución fijadora pasa a los vasos venosos y de aquí a la aurícula derecha (Ad), donde desagua por la incisión practicada en la misma.

Fijación por inmersión y crioprotección. El proceso de fijación y crioprotección tiene como objeto conservar la morfología y composición del tejido. Para ello las preparaciones fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PB con concentraciones crecientes de sacarosa: 1) paraformaldehído 4 %, 30 minutos; 2) 10% de sacarosa en paraformaldehído 4%, 90 minutos; 3) 20% de sacarosa en paraformaldehído 4%, 120 minutos; terminando la crioprotección en 30% de sacarosa, 12 horas. La sacarosa crea un medio hiperosmótico que evita la formación de microcristales intracelulares al congelar éste. Una vez terminado el proceso de fijación y crioprotección el tejido fue congelado de forma rápida introduciendo las preparaciones en isopentano congelado con nitrógeno líquido (*snap frozen*). Posteriormente, los tejidos convenientemente identificados, fueron almacenados a -80°C .

Whole-mount. Diferentes pruebas han permitido observar que se obtiene una mejor caracterización morfológica de la densidad de innervación empleando capas gruesas de tejido de aproximadamente $100\ \mu\text{m}$ (*whole-mount*) que utilizando los cortes convencionales en un criostato. Tanto en la uretra como en la vejiga, se obtuvieron preparaciones independientes de la capa muscular y de la lámina propia separando ambas mediante tijeras de microdissección bajo una lupa. En el caso del cuerpo cavernoso, se obtuvieron con la ayuda de tijeras de microdissección cortes muy finos del tejido (aproximadamente de $100\ \mu\text{m}$ de espesor).

Cortes en criostato. Los estudios histológicos de hematoxilina-eosina (H&E), y algunos estudios de inmunofluorescencia (visualización de cGMP, eNOS y vimentina en cuerpo cavernoso), se llevaron a cabo en cortes transversales o longitudinales obtenidos en un criostato (CM1850 UV, Leica Microsystems, Barcelona, España). La pieza congelada se incluyó en un molde tallado de Tissue-Tek® para asegurar la integridad del corte. El grosor de las secciones fue de 10 μm , y la orientación del corte fue transversal en el caso de la uretra y la vejiga permitiendo la visualización de las diferentes capas histológicas que las conforman. En la vejiga se realizaron cortes de la zona del detrusor, y los de la uretra fueron de la zona más proximal. En el cuerpo cavernoso se obtuvieron cortes longitudinales para preservar la integridad del tejido. Los cortes se recogieron de forma seriada en portaobjetos con L-polilisina, albergando cada uno de 8 a 10 cortes. Estos se dejaron secar 24 horas a temperatura ambiente (RT), tras lo cual fueron mantenidos en un congelador a -20°C hasta su posterior utilización.

3.2.3.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina

Esta técnica permite comprobar la integridad de los cortes y estudiar la estructura del tejido en los mismos, ya que la eosina (rojo) colorea componentes y orgánulos citoplasmáticos, colágeno y fibras musculares, en tanto que la hematoxilina (azul) tiñe los núcleos.

El procedimiento empleado para la tinción comprende los siguientes pasos: 1) hidratación en agua destilada, 3 minutos; 2) incubación con hematoxilina, 6 minutos; 3) lavado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante; 4) incubación con eosina 1%, 6 minutos; 5) deshidratación con etanol de graduación ascendente: 50°, lavado; 70, 90, 96°, 4 minutos; absoluto, 7 minutos; 6) deshidratación con xilol, 10 minutos (tres veces en distintas cubetas); 7) montaje de las preparaciones con DePex. Se dejaron secar al menos 24 horas, y se almacenaron en una caja opaca a RT hasta su observación al microscopio en campo claro. Se obtuvieron fotografías representativas con una cámara digital (Spot-2) y se almacenaron utilizando el programa MetaMorph 6.1. Estas imágenes fueron procesadas con el programa informático Adobe Photoshop CS. Versión 8.0.1., realizando únicamente ajustes globales de brillo y contraste cuando fue necesario.

3.2.3.3. Inmunohistofluorescencia

Se utilizó inmunofluorescencia indirecta cuyos anticuerpos secundarios estaban acoplados a los siguientes fluoróforos: Alexa fluor 488 (λ_{EX} : 495 nm, λ_{EM} : 519 nm, verde); y Alexa fluor 594 (λ_{EX} : 590 nm, λ_{EM} : 617 nm, rojo).

Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

1. Hidratación de las preparaciones *whole-mount* en placas de pocillos, o de los cortes recogidos en los correspondientes portaobjetos, por medio de tres lavados sucesivos en PB 0,1 M, pH 7,4 de 5 minutos cada uno.
2. Bloqueo de la unión inespecífica al tejido empleando la solución bloqueante (500 µL/pocillo o portaobjetos) que contiene suero del animal donde ha sido desarrollado el anticuerpo secundario (NSD) y detergente TX-100 para permeabilizar. Esto se consigue por medio de 3 lavados sucesivos de 10 minutos bajo agitación en las preparaciones *whole-mount* o incubándolos en cámara húmeda durante 2 horas a RT en el caso de los cortes.
3. Incubación con el anticuerpo primario a la concentración adecuada en solución diluyente que también contiene NSD y TX-100 (500 µL/pocillo o portaobjetos), durante 48 horas en las placas de pocillos en el caso de las preparaciones *whole-mount*, y durante 24 horas en cámara húmeda en los cortes, a 4 °C en ambos casos.
4. Lavado con PB 0,1 M, pH 7,4 tres veces durante 10 minutos cada uno.
5. Incubación con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo correspondiente a una concentración 1:200 (cortes) o 1:400 (*whole-mount*) en solución diluyente (500 µL/pocillo o portaobjetos) durante 2 horas, en oscuridad y RT en ambos casos, y además en agitación sólo en el caso del *whole-mount*.
6. Lavado con PB 0,1 M, pH 7,4 tres veces durante 10 minutos cada uno.
7. Montaje de las preparaciones empleando un medio de montaje provisto de protector de la fluorescencia (Prolong®Gold antifade reagent), previo estiramiento de las preparaciones *whole-mount* sobre un portaobjetos.

A continuación, se dejaron secar aproximadamente 12 horas a RT, y se observaron en microscopio de fluorescencia (Axioplan 2, Carl Zeiss microimaging, Göttingen, Germany) equipado con los filtros apropiados. Las preparaciones fueron fotografiadas con una cámara digital (Spot-2) y almacenadas como imágenes de 12 bits mediante el programa MetaMorph 6.1.

La **inmunofluorescencia doble** sigue el mismo protocolo de ejecución que la simple, con la diferencia de que el mismo tejido es sometido a dos anticuerpos primarios distintos, y éstos reconocidos por dos anticuerpos secundarios con dos fluorocromos diferentes. Las inmunofluorecencias dobles realizadas fueron:

- VACHT-nNOS
- TSH-nNOS
- VACHT-vimentina
- TSH-vimentina
- cGMP-vimentina

En todos los casos, se realizaron controles negativos, omitiendo los anticuerpos primarios.

Anticuerpo primario anti-(especie obtención)	Dilución del Ac 1°	Anticuerpo secundario + fluoróforo	Dilución del Ac 2°
VACHT (cabra)	1:200	Anti-cabra de asno + Alexa fluor 488 (verde)	1:400
nNOS (conejo)	1:500	Anti-conejo de asno + Alexa fluor 594 (rojo)	1:400
eNOS (conejo)	1:500	Anti-conejo de asno + Alexa fluor 488 (verde)	1:200
TSH (oveja)	1:400	Anti-oveja de asno + Alexa fluor 488 (verde)	1:400
Vimentina (conejo)	1:500	Anti-conejo de asno + Alexa fluor 594 (rojo)	1:400 (<i>Whole-mount</i>) 1:200 (cortes)
cGMP (oveja)	1:2000	Anti-oveja de asno + Alexa fluor 488 (verde)	1:400 (<i>Whole-mount</i>) 1:200 (cortes)

Tabla I. Anticuerpos empleados para los ensayos de inmunohistofluorescencia.

Se obtuvieron imágenes a 10, 20, 40, 63 y 100X (empleando para los dos últimos aumentos objetivos de inmersión) correspondientes a los respectivos fluoróforos de emisión en longitudes de onda correspondientes al rojo (Alexa Fluor 594) y verde (Alexa Fluor 488).

Las imágenes a 10 y 20X se emplearon para la cuantificación de fluorescencia como se indica en el apartado de análisis de datos. Las imágenes a mayores aumentos fueron empleadas para mostrar detalles (40, 63 y 100X). En todos los casos, las imágenes que se muestran en las figuras fueron procesadas con el programa informático Adobe Photoshop CS. Versión 8.0.1, donde sólo se ajustó en algunos casos el contraste y el brillo globales.

Las preparaciones en las que se obtuvo un mejor marcaje fueron observadas mediante *microscopía confocal* (Leica SP2 Estativo DMIRE2, Heilderberg, Alemania). Se fotografiaron diferentes planos del tejido cada 2 µm en el eje Z. Toda la serie de fotografías que se obtuvo de cada preparación y la proyección Z del mismo se almacenaron como imágenes TIF mediante el programa LCS Lite (Leica Microsystems, Heilderberg, Alemania). Posteriormente con dicha serie de fotografías se reconstruyó la imagen tridimensional del tejido mediante el programa ImageJ, obteniéndose también videos de esta imagen tridimensional en formato avi.

3.2.4. Inmunolocalización de la producción de cGMP

Con el objetivo de provocar la acumulación persistente de cGMP en el tejido para su visualización por inmunohistofluorescencia, preparaciones uretrales y de cuerpo cavernoso montadas en baños de órganos y precontraídas con NA o AVP, fueron estimuladas mediante EFS (4 Hz) o DEA/NO exógeno (0,1 mM), de forma continua durante 4 minutos. La estimulación se realizó en presencia de inhibidores de las PDE (IBMX y zaprinast; ambos a 0,1mM), añadidos 30 segundos antes de la estimulación, con el fin de impedir la degradación del nucleótido y por lo tanto permitir su acumulación en el tejido, de acuerdo al procedimiento descrito previamente (García-Pascual *et al.* 2008). El procedimiento experimental se llevó a cabo en presencia de guanetidina (50µM) y atropina (1µM), y adicionalmente de d-tubocurarina (0,1µM) en el caso de la uretra. En algunas preparaciones, se analizó el efecto del pretratamiento con ODQ (0,1 mM; 30 min) o L-NOARG (0,1 mM; 30 min) sobre estas respuestas relajantes, así como la adición exclusiva de IBMX y zaprinast durante 4 minutos.

Una vez transcurridos los 4 minutos de estimulación las preparaciones fueron recogidas rápidamente, fijadas en paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, (pH 7,4), y sometidas a crioprotección y congelación. A continuación se obtuvieron cortes de 10 µm en un criostato (cuerpo cavernoso) o preparaciones *whole-mount* (uretra). Posteriormente se siguió el protocolo de inmunohistofluorescencia detallado en el punto 2.3.3. utilizando anticuerpos anti-cGMP como anticuerpo primario (Tabla 1).

3.2.5. Análisis de datos

3.2.5.1. Respuestas contráctiles y relajantes

Las respuestas contráctiles se han expresado como porcentaje de la contracción inducida por KCl (120 mM) de cada preparación, aunque en ocasiones se expresaron en valores absolutos (mN). Las respuestas relajantes fueron normalizadas como fracción de la tensión previa inducida por NA o AVP según el caso. Los valores de EF_{50} y EC_{50} representan la frecuencia de estimulación o la dosis de agonista, respectivamente, en la que se obtiene el 50% de la respuesta máxima (E_{max}). En algunos casos se midió en cada respuesta contráctil el valor de tensión máxima (F_0), el área bajo la curva (AUC), así como la velocidad de respuesta midiendo la pendiente de la curva inicial de contracción o de relajación (dF/dt). En todos los casos se utilizaron como controles preparaciones paralelas tratadas únicamente con el solvente. Todas las determinaciones se realizaron utilizando el programa informático Chart 5. Versión 5.5.1 para Macintosh.

3.2.5.2. Cuantificación de la reacción de inmunohistofluorescencia

Se realizó determinando el porcentaje de área que superaba un umbral de intensidad de fluorescencia previamente determinado (% de área por encima del umbral), mediante el programa MetaMorph 7.0. El umbral fue establecido al nivel adecuado para eliminar el fondo o marcaje inespecífico. Se analizaron por separado áreas de la capa de la lámina propia y de la capa muscular. Las áreas analizadas fueron dibujadas a mano alzada con una extensión similar en las distintas imágenes. El valor medio de las áreas analizadas en la capa muscular fue de $59375 \pm 9079 \mu\text{m}^2$ (n=30) a 10X y $12951 \pm 2149 \mu\text{m}^2$ (n=27) a 20X para la vejiga; $73291 \pm 8603 \mu\text{m}^2$ (n=31) a 10X y $16469 \pm 1628 \mu\text{m}^2$ (n=93) a 20X para la uretra; y $5621 \pm 373,4 \mu\text{m}^2$ (n=79) a 20X para el cuerpo cavernoso. El valor medio de las áreas analizadas en la lámina propia fue de $62882 \pm 12063 \mu\text{m}^2$ (n=28) a 10X y $13784 \pm 1852 \mu\text{m}^2$ (n=26) a 20X para la vejiga; y $61678 \pm 7404 \mu\text{m}^2$ (n=33) a 10X y $15833 \pm 1044 \mu\text{m}^2$ (n=99) a 20X para la uretra. Para cada grupo experimental, las mediciones se realizaron en no más de 3 preparaciones de cada animal, utilizando al menos 3 animales distintos procedentes a su vez de 3 reacciones distintas realizadas en diferentes días. Todas las fotografías se obtuvieron con el mismo tiempo de exposición para permitir la comparación directa entre ellas.

3.2.5.3. Estudio estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, siendo n el número de animales utilizados para cada determinación. Las diferencias entre grupos se analizaron empleando el test del análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test Newman-Keuls *post hoc*. Las comparaciones de medias de dos grupos experimentales se realizaron empleando el test de la t de Student (pareado o no pareado según el caso). El nivel de significación mínimo fue establecido en $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.0.

IV. RESULTADOS

4.1. DIFERENCIAS EN EL ESTADO DE SALUD GENERAL Y UROLÓGICA ENTRE RATONES SAM-R1 Y SAM-P8

4.1.1. Cambios en el aspecto externo de los animales

Los ratones SAM-P8 de 9-10 meses de edad ya presentaban el típico aspecto de animal envejecido: desorientación debido a una posible pérdida de visión por frecuentes ulceraciones oculares, pérdida de movimiento, disminución en el peso, piloerección y desplazamiento anormal del apéndice xifoides hacia el exterior. Estos signos externos de envejecimiento fueron más aparentes en los machos que en las hembras. La **figura 1** muestra la imagen de un grupo de ratones macho SAM-P8 en comparación con los ratones SAM-R1 de la misma edad, los cuales presentaban el aspecto normal de un animal joven y sano.

Tras el sacrificio y la disección, no se observaron grandes diferencias en los órganos internos de estos dos grupos de animales. Algunos de los ratones SAM-P8 (5-10%) presentaron tumores en diversos órganos, pero nunca en el tracto urinario inferior.

4.1.2. Variaciones en el peso corporal y de los órganos genitourinarios

Tanto el peso total del animal como el de los órganos genitourinarios (vejiga, cuerpo cavernoso y uretra) fue medido en 30 animales de cada grupo (SAM-P8 y SAM-R1, machos y hembras), inmediatamente después de su sacrificio.

En ambos sexos se observó una disminución estadísticamente significativa del peso corporal, de un 15% aproximadamente, en los ratones SAM-P8, en comparación con los animales SAM-R1 del mismo sexo (**Fig. 2**). Así, el peso medio de los ratones SAM-P8 fue de $32,0 \pm 0,7$ g en los machos y $30,7 \pm 1,4$ g en las hembras respectivamente, en comparación con los de los SAM-R1 que fueron de $38,4 \pm 1,0$ g para los machos y $35,2 \pm 0,9$ g para las hembras (n=30).

Por el contrario el peso de los órganos genitourinarios, tanto vejiga como uretra y cuerpo cavernoso no fue significativamente diferente entre los ratones SAM-P8 y los SAM-R1 al ser expresado como porcentaje del peso corporal (**Fig. 2**). Aunque hay que destacar una considerable diferencia en el peso de la vejiga entre ratones machos y hembras de ambas estirpes, siendo aproximadamente 2 veces y media mayor en los machos que en las hembras. Así, el peso de la vejiga de ratones SAM-P8 fue de un $1,9 \pm 0,2$ % del peso corporal en machos y un $0,7 \pm 0,1$ % en hembras. Igualmente, en ratones SAM-R1 la relación entre machos y hembras fue de $1,5 \pm 0,1$ % del peso corporal en machos y $0,7 \pm 0,1$ % en hembras (n=30) (**Fig. 2**).

4.1.3. Cambios en el patrón miccional

El análisis del número de micciones por hora (después de una hora de restricción de agua) mostró un aumento en el número de micciones totales y especialmente de bajo volumen (huella de diámetro inferior a 0,5 cm) lo que es indicativo de la existencia de urgencia urinaria (**Fig. 3**). Así, la frecuencia de micciones totales en los animales SAM-P8 fue $25,8 \pm 5,3$ micciones/h en machos y $11,6 \pm 3,4$ micciones/h en hembras (n=28) mientras que en SAM-R1 fue de $12,5 \pm 4,1$ micciones/h en machos y $2,2 \pm 0,5$ micciones/h en hembras (n=27). Los valores para el número de micciones de pequeño tamaño fueron $24,6 \pm 5,2$ y $11,3 \pm 3,4$ micciones/h (n=28), en machos y hembras SAM-P8 respectivamente, vs $8,8 \pm 3,2$ y $1,7 \pm 0,4$ micciones/h (n=27), para machos y hembras SAM-R1 (**Fig. 4**). Como puede observarse la frecuencia miccional fue más alta en los machos que en las hembras, en ambas estirpes y en todas las situaciones.

4.2. VEJIGA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1

4.2.1. Cambios estructurales

La vejiga del ratón es una estructura esférica que se localiza en la parte inferior de la cavidad abdominal. Macroscópicamente se pueden diferenciar tres partes según su distancia a la uretra: cúpula (parte más superior), detrusor (cuerpo de la vejiga) y trigono (parte inferior comprendida entre los uréteres y el esfínter uretral interno).

Con el objeto de detectar cambios estructurales debidos al envejecimiento se realizaron cortes transversales de la zona del detrusor de ratones envejecidos y controles teñidos con H&E y se analizó la estructura de la pared vesical (**Fig. 5**).

En ambos casos se pueden distinguir las siguientes capas en la pared vesical:

- Mucosa o urotelio: constituido por un epitelio plano estratificado, con células de morfología redonda o poligonal dispuestas en varias capas.
- Submucosa o lámina propia: compuesta de tejido conjuntivo laxo, con un gran número de vasos sanguíneos.
- Capa muscular: constituida por numerosos haces de fibras musculares lisas en disposición longitudinal, oblicua y circular.
- Serosa o adventicia: formada de tejido conjuntivo laxo y adiposo.

El análisis cualitativo de la tinción de H&E no mostró diferencias significativas entre los animales SAM-P8 y SAM-R1. El grosor tanto de la lámina propia como de la capa muscular fue el mismo para ambas estirpes de ratones (*Lámina propia*: 325 ± 75 y 330 ± 40 μm en hembras y machos SAM-P8 respectivamente, *vs* 286 ± 22 y 302 ± 30 μm para hembras y machos SAM-R1. *Capa muscular*: 375 ± 25 y 413 ± 35 μm en hembras y machos SAM-P8 respectivamente, *vs* 406 ± 34 y 431 ± 46 μm para hembras y machos SAM-R1, $n=5$). Ocasionalmente se observó infiltración celular en la zona de la submucosa de los ratones SAM-P8 (**Fig. 5**).

4.2.2. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por una alta concentración de K^+ extracelular

Como muestran las **figuras 6 y 7**, la aplicación de una alta concentración de KCl en preparaciones vesicales aisladas originó una respuesta contráctil característica que no fue, sin embargo, diferente entre ratones SAM-P8 y SAM-R1 (tanto en hembras como en machos), indicativo de que la capacidad contráctil del músculo vesical en los ratones envejecidos no está alterada.

Sin embargo, sí se observaron diferencias sexuales en ambas estirpes de ratones, ya que las preparaciones vesicales procedentes de machos desarrollaron una respuesta contráctil 1,5 veces mayor aproximadamente que la de las hembras ($9,6 \pm 0,8$ mN, $n= 17$ en machos *vs* $7 \pm 0,8$ mN, $n= 18$ en hembras SAM-R1 y $10,8 \pm 1,2$ mN, $n= 17$ en machos *vs* $7,3 \pm 0,7$ mN, $n= 18$ en hembras SAM-P8) (**Fig. 6 y 7**).

4.2.3. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por EFS

Los resultados de este estudio se presentan por separado en ratones machos y hembras, debido a las diferencias sexuales observadas en la contractilidad de origen neurogénico.

4.2.3.1. Hembras

a) Respuesta contráctil inducida por EFS en la vejiga de ratones hembra

La estimulación eléctrica transmural (1-50 Hz) de tiras longitudinales de vejiga de ratones hembra originó contracciones fásicas transitorias similares en ambas estirpes, cuya magnitud fue frecuencia-dependiente, alcanzando su respuesta máxima a 45 Hz aproximadamente (**Figs. 8 y 9**). Sin embargo la magnitud de dicha respuesta máxima (E_{max}), expresada como porcentaje de la contracción a KCl (120 mM), fue significativamente mayor en los animales SAM-P8 (**Tabla 1**), produciéndose además un

desplazamiento hacia la izquierda de la curva frecuencia–respuesta y una reducción aproximadamente a la mitad de la EF_{50} en SAM-P8 (**Tabla 1**). Estos resultados muestran un claro aumento en la sensibilidad a la estimulación neurogénica de la vejiga de las ratonas envejecidas.

b) Mediadores implicados

Para determinar los mediadores implicados en las respuestas contráctiles obtenidas mediante EFS, se incubó el tejido con antagonistas de los diferentes neurotransmisores o mediadores.

En las ratonas SAM-R1 el bloqueo de los receptores muscarínicos con **atropina** (1 μ M, 30 min) provocó una inhibición significativa de la curva frecuencia-respuesta reduciendo el efecto máximo (E_{max}) en aproximadamente un 60% de la respuesta control (**Figs. 10 y 11; Tabla 2**). La posterior desensibilización de los receptores purinérgicos con **$\alpha\beta$ -Metilen-ATP** (100 μ M, 30 min), fue capaz de reducir las contracciones que se obtuvieron en presencia de atropina, en otro 24%, persistiendo una respuesta residual de aproximadamente un 15% del control en presencia de los dos inhibidores (**Figs. 10 y 11; Tabla 2**). Sin embargo, la posterior incubación con el inhibidor no selectivo de la COX **indometacina** (30 μ M, 30 min) no provocó una mayor inhibición de la ya originada por atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (**Figs. 10 y 11; Tabla 2**). Por lo tanto se puede considerar que en la ratona joven la contracción vesical producida por EFS es predominantemente colinérgica con una menor participación de la liberación de ATP de nervios purinérgicos y en la que no participa la producción de PGs derivadas de la ciclooxigenasa.

En las ratonas SAM-P8 el tratamiento con **atropina** (1 μ M, 30 min) redujo la amplitud de E_{max} en aproximadamente un 48% de la respuesta control. Sin embargo, al ser en este caso la contracción de mayor amplitud (un 63% aproximadamente), cuando los resultados se expresan en porcentaje de la contracción inducida por KCl la contracción resistente a atropina fue de un 87% en SAM-P8 frente a un 41% en SAM-R1, aproximadamente (**Figs. 10 y 11; Tabla 2**). La posterior inhibición de los receptores purinérgicos con **$\alpha\beta$ -Metilen-ATP** (100 μ M, 30 min) en presencia de atropina redujo la respuesta a un 45% de la contracción inducida por KCl en comparación con un 17% en SAM-R1 en las mismas condiciones (**Figs. 10 y 11; Tabla 2**). Sin embargo, si comparamos el porcentaje de inhibición de la contracción resistente a atropina por $\alpha\beta$ -Metilen-ATP en ambas estirpes, se puede observar una inhibición que oscila entre un 60% en SAM-R1 a un 50%, aproximadamente, en SAM-P8 (**Tabla 2**). Estos resultados sugieren que la participación relativa de la ACh y el ATP es muy similar en ambas estirpes, aunque en los animales envejecidos una mayor liberación de ambos mediadores o una mayor sensibilidad del tejido a los mismos daría lugar a contracciones de mayor amplitud. Pero el hecho de que persista una mayor respuesta residual en ratonas SAM-

P8 resistente a la inhibición colinérgica y purinérgica que en las ratonas SAM-R1, sugiere la implicación de otro mediador.

A diferencia de los ratones hembra SAM-R1, la inhibición de la síntesis de PGs con **indometacina** (30 μ M, 30 min), en presencia de atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP, produjo una inhibición adicional de la E_{\max} de un 63%, reduciendo la respuesta a un 17% de la contracción inducida por KCl, valor similar al obtenido en ratones hembras SAM-R1 en presencia de atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (**Figs.10 y 11; Tabla 2**). Estos resultados sugieren la participación de alguna PG derivada de la actividad de la COX en la contracción neurogénica de ratones hembra SAM-P8, pero no en SAM-R1 que podrían estar implicadas en el aumento de contractilidad neurogénica.

Con el fin de analizar en mayor profundidad la participación relativa de los diferentes mediadores en la contracción neurogénica de ratones hembras SAM-P8 y SAM-R1, se evaluó el efecto de atropina, $\alpha\beta$ -Metilen-ATP e indometacina, sobre la amplitud de la contracción (F_0), el área bajo la curva (AUC) y la velocidad de contracción (dF/dt), comparando el efecto sobre la respuesta máxima (obtenida a 45 Hz) y una respuesta media (a 20 Hz). En la **figura 12** y la **tabla 3** se muestran estos resultados.

Los valores de contractilidad F_0 y AUC tanto de la respuesta máxima (45 Hz) como de la respuesta media (20 Hz) muestran claramente un aumento en la contractilidad neurogénica en los ratones hembra envejecidos que oscila entre un 40 y un 60% en comparación con los animales jóvenes. El efecto de la atropina fue muy similar para ambas estirpes de ratones. Así, tanto los valores de F_0 y AUC a 45 y a 20 Hz fueron reducidos en torno a un 40-55% en comparación con los controles (**Tabla 3**). Por lo tanto, la participación colinérgica no parece modificarse con el envejecimiento y el hecho de que la respuesta resistente a la atropina sea significativamente mayor en los animales SAM-P8 que en los SAM-R1 (**Tabla 3**), puede ser atribuida a la mayor contribución de otros mediadores. De igual forma, el tratamiento con $\alpha\beta$ -Metilen-ATP originó una inhibición en los valores de F_0 y AUC tanto en las contracciones inducidas por 20 como por 45 Hz que osciló entre un 50-60 % de la respuesta resistente a atropina en ratones SAM-R1 y SAM-P8 (**Tabla 3**). Después del tratamiento con atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP persisten las diferencias entre los valores de F_0 y AUC entre ambas estirpes, aunque a la frecuencia máxima no alcanzaron la significación estadística (**Tabla 3**). Estos resultados sugieren que la participación proporcional de ACh y ATP en ambas estirpes de ratonas no es significativamente diferente, en concordancia con los resultados descritos previamente sobre la curva frecuencia-respuesta completa.

Por último, el tratamiento con indometacina originó solo en animales SAM-P8 una inhibición significativa de las respuestas contráctiles resistentes a atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP. Este efecto se observó tanto en los valores de F_0 , como AUC y dF/dt para 45 y 20

Hz (**Tabla 3**). Estos resultados corroboran la participación de las PGs en la mayor contractilidad de la vejiga de ratones hembras envejecidas.

Con respecto a la velocidad de contracción, los valores de la pendiente (dF/dt) de la respuesta a 45 Hz no mostraron diferencias significativas entre ambas estirpes de ratones. En la contracción a 20 Hz si se observó un aumento significativo de los valores dF/dt en animales SAM-P8 que apareció tanto en condiciones control como en presencia de atropina y de atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (**Fig. 12, Tabla 3**). Por lo tanto esta mayor velocidad de las contracciones vesicales de hembras envejecidas no parece estar relacionada con las variaciones observadas en la liberación de los diferentes mediadores contráctiles. La incubación con indometacina, inhibió las diferencias entre ambas estirpes (**Fig. 12, Tabla 3**), sugiriendo la participación de las PGs en la mayor velocidad de las contracciones en animales SAM-P8.

4.2.3.2. Machos

a) Respuesta contráctil inducida por EFS

En las preparaciones vesicales de machos SAM-R1 la respuesta contráctil frecuencia dependiente inducida por EFS alcanzó su máximo valor a los 40 Hz. En los animales SAM-P8, al igual que ocurría en las hembras, las contracciones fueron de mayor amplitud (aproximadamente un 20%) en los animales envejecidos, en los que además el efecto máximo se obtuvo a una menor frecuencia (25 Hz). Asimismo, el valor de EF_{50} fue aproximadamente la mitad en machos SAM-P8 que en controles SAM-R1 (**Figs. 13 y 14; Tabla 4**). Por lo tanto, el envejecimiento se acompaña en ambos sexos de un aumento en la contractilidad neurogénica vesical.

b) Mediadores implicados

En el caso de la vejiga de los ratones macho, el bloqueo de los receptores muscarínicos con atropina (1 μ M, 30 min) originó una gran inhibición de la curva frecuencia-respuesta de animales SAM-R1 (reducción aproximada de E_{max} de un 72%, **figs 15 y 16; Tabla 5**), que fue mayor que la observada en hembras (reducción aproximada de E_{max} de un 60%, **figs. 10 y 11; Tabla 2**). Esta inhibición fue sin embargo inferior en machos envejecidos (15-20% aproximadamente, **Tabla 5**). Estos resultados indican el gran predominio colinérgico de la contracción neurogénica de la vejiga masculina en el ratón, siendo mayor que en la hembra y cómo este predominio colinérgico se reduce con el envejecimiento.

El tratamiento con el análogo del ATP $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (100 μ M, 30 min) provocó una inhibición prácticamente completa de la respuesta residual a atropina tanto en los

animales SAM-R1 como SAM-P8 (**Figs. 15 y 16; Tabla 5**). Además, la respuesta residual tras el tratamiento con $\alpha\beta$ -Metilen-ATP no fue significativamente afectada por la adición de indometacina (30 μ M) en ambos casos. Estos resultados sugieren que las PGs no participan en la hipercontractilidad de la vejiga masculina de ratones envejecidos, siendo la mayor liberación neurogénica de ATP el probable responsable de este aumento de contractilidad neurogénica.

La **figura 17** compara los valores de F_0 , AUC y dF/dt de las respuestas contráctiles inducidas por una frecuencia máxima (40 Hz) y media (20 Hz) en vejigas de ratones macho SAM-R1 y SAM-P8 y la **tabla 6** muestra el efecto de los diferentes antagonistas sobre estos parámetros. Como puede observarse los tres parámetros estudiados (F_0 , AUC y dF/dt) se muestran significativamente aumentados en los ratones SAM-P8 comparados con los SAM-R1 (**Fig. 17**). Hay que señalar que los cambios producidos en la relación frecuencia-respuesta en los ratones SAM-P8, en los que el efecto máximo se alcanza a los 25 Hz, hacen que mientras las respuestas a 20 Hz estén próximas a la EF_{50} en SAM-R1, sean más próximas al efecto máximo en SAM-P8, lo que hace difícil una comparación directa.

La atropina produjo una inhibición de los parámetros F_0 y AUC en animales SAM-R1 y SAM-P8 que osciló entre un 55 y un 70% de la contracción control previa sin que se evidencie una diferencia clara entre ambas estirpes. Esta inhibición fue ligeramente superior a la obtenida en las hembras, corroborando la mayor participación colinérgica en la contractilidad neurogénica de la vejiga masculina. El hecho de que la respuesta resistente a atropina sea significativamente superior en animales SAM-P8 que en SAM-R1 (**Tabla 6**), sugiere una mayor participación de mecanismos no colinérgicos en los animales envejecidos.

La posterior adición de $\alpha\beta$ -Metilen-ATP provocó una reducción adicional entre un 55-65% aproximadamente de la respuesta residual a atropina en ambas estirpes de ratones machos que provoca que desaparezcan las diferencias significativas entre los valores de F_0 y AUC entre ambos (**Tabla 6**). A diferencia de las hembras, el tratamiento con indometacina no modificó significativamente las contracciones residuales en ambas estirpes (**Tabla 6**). Estos resultados sugieren, en concordancia con lo expuesto anteriormente, que, con el envejecimiento se produce una disminución relativa del control colinérgico en favor del purinérgico en la contracción nerviosa vesical. A diferencia de las hembras la contribución del ATP a estas contracciones no colinérgicas parece ser mayor mientras que no participa la producción de PGs.

Con respecto a la velocidad de contracción, se encontraron diferencias significativas entre los machos normales y envejecidos en dF/dt tanto a 20 como a 40 Hz, siendo mayores los valores de los ratones SAM-P8 (**Tabla 6**). Similarmente a lo descrito

previamente en la hembra, el tratamiento consecutivo con atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP originó reducciones significativas en los valores de dF/dt en ambas estirpes. Sin embargo se siguen manteniendo valores significativamente más altos en animales SAM-P8 que en los controles jóvenes en presencia de estos inhibidores (**Tabla 6**). Por lo tanto, la mayor velocidad de contracción no es atribuible en su totalidad a la diferente liberación de los mediadores colinérgico y purinérgico.

4.2.4. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por ACh y ATP exógeno

Para evaluar la posible repercusión del envejecimiento sobre la capacidad de respuesta del músculo liso vesical a los principales neurotransmisores que intervienen en la contracción nerviosa (ACh y ATP) se realizaron curvas de contracción dosis-respuesta añadiendo dichos mediadores exógenamente en ambas estirpes de ratones.

La adición exógena acumulativa de ACh y ATP (10^{-8} a 10^{-2} M) originó una contracción dosis-dependiente de las preparaciones vesicales en todos los casos, produciendo ambos agonistas una contracción fásica del tejido, muy rápida en el caso del ATP (**Figs. 19 y 22**) y algo más lenta en el caso de la ACh (**Figs. 18 y 21**) en ambos sexos.

La máxima respuesta a la ACh tanto en los animales control como en los envejecidos y tanto en machos como en hembras se obtuvo a la concentración de 10^{-2} M, con valores respecto a la contracción inducida por KCl muy similares en todos los grupos (**Figs. 20 y 23**). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de pEC_{50} entre los animales SAM-P8 y SAM-R1 en el caso de la hembra (**Tabla 7**), mientras que en los machos el valor de pEC_{50} para los ratones envejecidos fue significativamente mayor que el de los animales control (**Tabla 8**). Estos resultados sugieren que la capacidad de respuesta del músculo a la ACh es similar en ambos sexos y que no se ve alterada con el envejecimiento en la hembra. En el macho sin embargo se observa una hipersensibilidad del músculo liso al efecto de la ACh en los animales envejecidos.

Con respecto a las respuestas inducidas por el ATP hay que señalar en primer lugar que no se obtuvo en todos los casos una respuesta máxima clara a la dosis más alta empleada (10^{-2} M), por lo que los valores de E_{max} son simplemente orientativos. Así, mientras que en las hembras la respuesta a la dosis de 10^{-2} M de ATP fue mayor en los animales SAM-R1 que en los SAM-P8, en éstos se observa claramente como la curva dosis-respuesta no ha alcanzado todavía el efecto máximo (**Fig. 20; Tabla 7**). En los machos sin embargo, la curva dosis-respuesta no alcanza el efecto máximo en ambas estirpes y la respuesta a 10^{-2} M de ATP es significativamente mayor en animales SAM-P8 que SAM-R1 (**Fig. 23; Tabla 8**). Analizando los valores de pEC_{50} para el ATP se observa claramente cómo la sensibilidad al ATP es similar en machos y hembras

mientras que se ve aumentada en animales envejecidos de ambos sexos, obteniéndose en éstos valores significativamente más altos de pEC_{50} para el ATP que en los animales control (**Tablas 7 y 8**). Por lo tanto estos resultados sugieren que se produce una hipersensibilidad del músculo detrusor al ATP con el envejecimiento.

4.2.5. Cambios en la densidad de innervación vesical

4.2.5.1. Innervación colinérgica

Con el fin de estudiar las posibles modificaciones en la densidad y distribución de nervios colinérgicos en la vejiga con el envejecimiento se procedió a la inmunodetección del transportador vesicular de la acetilcolina (VACHT) en preparaciones *whole-mount* de lámina propia y capa muscular de ambos sexos de ratones SAM-P8 y SAM-R1. Esta inmunodetección está considerada como una herramienta válida y específica para la visualización de los nervios colinérgicos en el sistema nervioso central y periférico (Weihe *et al.* 1996).

Los resultados muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular y lámina propia de vejigas SAM-R1 hembra (**Fig. 24**) y macho (**Fig. 25**) y de vejigas SAM-P8 hembra (**Fig. 26**) y macho (**Fig. 27**), respectivamente. Se observa como la inmunorreactividad a VACHT se localiza en una densa red de fibras colinérgicas distribuidas de forma uniforme por las diferentes regiones de la capa muscular (cúpula, detrusor y trigono), adoptando una disposición paralela a los haces musculares. En la lámina propia, sin embargo, la densidad de los nervios colinérgicos es más variable y con una disposición más irregular y numerosas ramificaciones. En ocasiones se aprecia la disposición de fibras nerviosas positivas a VACHT rodeando un vaso sanguíneo (**Figs. 25F y 29E**). Las **figuras 28 y 29** muestran detalles a mayores aumentos de estas fibras colinérgicas que aparecen como terminaciones nerviosas muy finas formadas por numerosas varicosidades. Se detectó además como las células epiteliales del urotelio presentaban fuerte inmunorreactividad a VACHT (**Fig. 28 C**). No se observó inmunorreactividad en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (resultados no mostrados).

La cuantificación de la densidad de fibras colinérgicas se realizó midiendo el porcentaje de área inmunorreactiva que superaba un valor umbral y los resultados se presentan en las **figuras 30-33**. La **figura 30** muestra una distribución uniforme en la densidad de fibras colinérgicas en la capa muscular de todas las regiones de la vejiga (cúpula, detrusor y trigono) con valores similares en el macho y en la hembra SAM-R1. Por el contrario, la densidad de innervación en la lámina propia fue mucho mayor en las hembras que en los machos, especialmente en la zona del trigono. En los animales SAM-P8 se observó un aumento significativo de la innervación colinérgica en la lámina propia

del trigono y del detrusor en la hembra (**Fig. 31**) o solo del trigono en el caso del macho (**Fig. 32**). Con respecto a la capa muscular la densidad de innervación no fue significativamente diferente de los animales SAM-R1, aunque los valores son ligeramente superiores en las hembras envejecidas, no llegan a alcanzar la significación estadística (**Figs. 31 y 32**). Por último, en la **figura 33** se observa como en los ratones SAM-P8 se magnifican las diferencias sexuales en la densidad de innervación colinérgica sobre todo en la lámina propia donde los valores son 3 o 4 veces superiores en la hembra que en el macho. En la capa muscular también aparecen valores superiores en la hembra que alcanzan significación estadística en el trigono (**Fig. 33**). En resumen, el envejecimiento provocó un claro aumento en la densidad de innervación colinérgica en la lámina propia, especialmente en la hembra y especialmente en la zona del trigono, mientras que sus efectos sobre la densidad de innervación de la capa muscular son variables en los distintos sexos, con ligeros aumentos en la capa muscular del trigono también en la hembra.

4.2.5.2. Innervación nitrérgica

Para determinar las posibles alteraciones en la densidad y distribución de las fibras nerviosas nitrérgicas de la vejiga con el envejecimiento se llevó a cabo la inmunodetección de nNOS, la enzima encargada de la síntesis de NO en los nervios, en preparaciones *whole-mount* de lámina propia y capa muscular de vejigas de ratones SAM-R1 y SAM-P8 de ambos sexos.

Las imágenes representativas de inmunofluorescencia de nNOS en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular y lámina propia de la vejiga se muestran para la hembra y el macho SAM-R1 en las **figuras 34 y 35**, respectivamente, y para la hembra y el macho SAM-P8 en las **figuras 36 y 37**, respectivamente. Las **figuras 38 y 39** muestran detalles a mayores aumentos de estas fibras nitrérgicas y de numerosos ganglios intramurales positivos a nNOS. Los nervios nitrérgicos se caracterizaron por no presentarse de forma uniforme en todas las regiones de la vejiga en ambos sexos. En la capa muscular tanto de detrusor como de cúpula la innervación era escasa y aparecía ocasionalmente en forma de terminaciones nerviosas finas o más frecuentemente en forma de pequeños troncos nerviosos dispersos siguiendo el curso de los haces musculares en algunos casos (**Figs. 34 y 35 A y C**). A menudo aparecían pequeños ganglios intramurales muy próximos a estos troncos nerviosos (**Fig. 38 F**). La innervación nitrérgica muscular del trigono fue más densa y presentaba numerosos troncos nerviosos gruesos en contacto con células inmunorreactivas constituyendo ganglios grandes formados por muchas células (**Figs. 34 E, 35 E, 38 A- C y 39 A y C**). Por otra parte en la lámina propia la innervación destaca por su alta densidad en el trigono (**Figs. 34-36 B, D y F**), apareciendo como una densa red de fibras de aspecto sinuoso. En esta capa se detectaron esporádicamente fibras nerviosas perivasculares (**Fig. 38 D**). Destaca también

la inmunorreactividad a nNOS de las células epiteliales del urotelio (**Fig. 38 E**). No se observó inmunorreactividad en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (resultados no mostrados).

Los resultados de cuantificación se muestran en las **figuras 40 a 43**. Destaca en primer lugar la existencia de importantes diferencias sexuales, caracterizadas por una densidad de innervación nitrérgica mucho más alta en la lámina propia de la hembra que del macho, mientras que se encontró lo contrario en la capa muscular, mayor densidad de innervación en el macho que en la hembra (**Fig. 40**). Comparando las distintas regiones vesicales la zona del trigono se mostró como la más rica en innervación nitrérgica tanto en capa muscular como en lámina propia (**Fig. 40**). En los ratones SAM-P8 destaca la presencia de una innervación nitrérgica más densa en la lámina propia, especialmente en la zona del detrusor, pero que también se extiende al trigono y a la cúpula en el caso de la hembra (**Figs. 41 y 42**). En los machos de la estirpe envejecida se observó una disminución significativa de la densidad nitrérgica en la capa muscular del detrusor con respecto a los machos control (**Fig. 42**). En estos animales se observaron las mismas diferencias de género descritas para los ratones SAM-R1, mayor densidad de innervación nitrérgica en la lámina propia en la hembra, en este caso incluso mayor que en los animales controles, y una mayor densidad en la capa muscular en los machos, aunque menos marcada que en los animales controles (**Fig. 43**). En resumen el principal efecto del envejecimiento parece ser un aumento en la densidad de innervación en la lámina propia, junto con una reducción de dicha densidad en la capa muscular del detrusor exclusivamente en el macho.

4.2.5.3 Innervación adrenérgica

Para identificar y caracterizar la innervación adrenérgica en ambas estirpes de ratones se utilizó la inmunodetección de la tirosina hidroxilasa (TSH), enzima encargada de la síntesis de la noradrenalina.

Finas y varicosas terminaciones nerviosas inmunorreactivas a TSH se localizaron en la capa muscular y lámina propia de la vejiga de ratones SAM-R1 y SAM-P8 de ambos sexos (**Figs. 44-47**). La distribución de nervios adrenérgicos en la capa muscular fue bastante dispersa especialmente en la cúpula y detrusor presentando mayor densidad en el trigono, especialmente en el macho (**Figs. 44 y 45 A, C, E**). Aquí aparecen gruesos troncos nerviosos asociados a algunos pequeños ganglios intramurales (**Fig. 48 A-C, 49 A,B**). En la lámina propia los nervios adrenérgicos se observaron con un trayecto sinuoso muchos de los cuales presentaban una disposición perivascular dibujando el trayecto de los vasos a través de la submucosa (**Figs. 44 y 45 B, D, F**). Especialmente en la lámina propia del trigono es donde la innervación se mostró más densa con numerosos troncos nerviosos gruesos ocasionalmente asociados a algunos ganglios de pequeño

tamaño (**Fig. 48 D-F, 49 C, D**). Al igual que en los casos anteriores, la eliminación del anticuerpo primario no originó marcaje significativo (datos no mostrados).

La cuantificación del porcentaje de área inmunorreactiva se muestra en las **figuras 50 a 53**. En primer lugar hay que destacar al comparar los resultados de ratones SAM-R1 machos y hembras la existencia de diferencias de género en la innervación adrenérgica caracterizadas por una mayor densidad de nervios TSH positivos en la capa muscular del macho, especialmente en el trigono (**Fig. 50**). La densidad adrenérgica en la lámina propia fue similar en ambos sexos, existiendo sólo una mayor densidad nerviosa estadísticamente significativa en la cúpula en el caso de la hembra (**Fig. 50**). En ambos sexos aparecieron diferencias regionales en la vejiga muy marcadas con una densidad de innervación mucho más alta en el trigono, que va disminuyendo progresivamente al acercarnos a la cúpula vesical. Este hecho fue especialmente marcado en la capa muscular aunque también se observa en la lámina propia y fue más evidente en la vejiga masculina (**Figs. 51 y 52**). En los animales SAM-P8 no se observaron cambios significativos en la densidad de nervios TSH positivos en el caso de la hembra, sólo un ligero aumento en la densidad adrenérgica de la lámina propia que no alcanzó la significación estadística (**Fig. 51**). Sin embargo en los machos se observó una reducción significativa de la innervación adrenérgica del detrusor y del trigono de la capa muscular, que también se dio en el trigono de la submucosa (**Fig. 52**). Estos cambios opuestos en ambos sexos producidos por el envejecimiento explican como al comparar los resultados de ratones SAM-P8 machos y hembras desaparezcan las diferencias en la densidad de innervación adrenérgica de la capa muscular, mientras que se magnifican las diferencias en la lámina propia, con una densidad de innervación significativamente inferior en los machos que en las hembras (**Fig. 53**).

4.2.6. Cambios en la densidad de ICCs vesicales positivas a vimentina

La identificación de ICCs en el tracto urinario se realizó mediante la utilización de anticuerpos primarios anti-vimentina, puesto que los filamentos intermedios de vimentina, aunque no son exclusivos de las ICCs, permiten distinguir estas células de las células musculares lisas, considerándose su marcaje una herramienta válida para la inmunodetección de ICCs (McCloskey, 2010).

Puesto que la vimentina no es específica de ICCs, la identificación de las mismas se basó además en la observación de sus características morfológicas, pudiendo aparecer en dos formas: fusiforme cuando se trata de células bipolares alargadas con escaso citoplasma y largas prolongaciones (**Figs. 58 C, D, 59 A**), y estrellada cuando de este mismo cuerpo celular central emanan múltiples prolongaciones (**Figs. 58 A, 59 B-D**). La inmunodetección de vimentina mostró una gran densidad de ICCs presentes en las diferentes capas y regiones vesicales formando redes muy densas (**Figs. 54-57**). En la

capa muscular frecuentemente se las encontraba siguiendo el curso de los haces musculares, siendo principalmente de forma fusiforme, aunque también se localizaron ocasionalmente ICCs de forma estrellada. Mientras tanto en la lámina propia destacó una densa red de ICCs de forma estrellada localizada a nivel subepitelial (**Fig. 58 A**), apareciendo algunas ICCs de tipo fusiforme en los niveles más internos de la capa (**Fig. 58 C, D**). Los controles negativos, en ausencia del anticuerpo primario, no mostraron marcaje significativo (datos no mostrados).

La cuantificación del porcentaje de área inmunorreactivo a vimentina se muestra en las **figuras 60-63**. En primer lugar destaca la existencia de una mayor densidad de inmunorreactividad para vimentina en hembras que en machos SAM-R1, tanto en la lámina propia como en la capa muscular (**Fig. 60**). Asimismo, de forma similar a lo que ocurre con la innervación adrenérgica y nitrérgica, aparece un gradiente regional de densidad de ICCs mayor en la zona del triángulo (tanto capa muscular como lámina propia) que va disminuyendo hasta la cúpula de la vejiga, más marcado en el caso de la hembra (**Figs. 61 y 62**). La comparación con los animales SAM-P8 muestra un aumento en la densidad de ICCs positivas a vimentina en la lámina propia de la zona del triángulo en ambos sexos (**Figs. 61 y 62**). En la capa muscular del triángulo también se observan aumentos en los valores de densidad que sin embargo no alcanzan significación estadística (**Figs. 61 y 62**). De esta forma, al comparar los valores de densidad de vimentina entre ambos sexos en ratones SAM-P8 se mantienen las diferencias observadas en los ratones SAM-R1, es decir mayor densidad en las hembras, pero en este caso aparece un aumento de densidad en la zona del triángulo en ambos sexos (**Fig. 63**).

4.2.7. Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la vejiga de ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1

Con el fin de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en los estudios morfológicos, en la **figura 64** se muestran unos gráficos resumen que exponen cuáles son las principales alteraciones morfológicas vesicales que se han encontrado en los ratones con envejecimiento prematuro.

En la capa muscular se observa que la densidad de innervación y de ICCs no sufre ninguna alteración significativa en el caso de las hembras, y en los machos únicamente se produce una disminución significativa de la innervación adrenérgica (triángulo y detrusor), y de la nitrérgica exclusivamente en la zona del detrusor.

En la lámina propia, por el contrario, se ha observado de forma generalizada un aumento de innervación colinérgica y nitrérgica, así como de ICCs, independientemente

del sexo del animal. Cabe destacar no obstante una diferencia de género, en el trigono de la lámina propia de los machos envejecidos se da una disminución de innervación adrenérgica que no ocurre en las hembras análogas.

4.2.8. Estudios de colocalización en la vejiga

4.2.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales

a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)

Para comprobar si existía alguna relación estructural entre la innervación colinérgica y la nitrérgica en la vejiga, se realizó una inmunofluorescencia doble de VACHT-nNOS.

En la **figura 65** se puede observar la distribución de fibras nitrérgicas (**A**) y colinérgicas (**B**) en la misma preparación de capa muscular de la cúpula y la colocalización de ambos marcadores en las varicosidades de algunas fibras nerviosas de la capa muscular pero no en todas (**C**), sugiriendo ésto que la nNOS está presente en parte en los nervios colinérgicos. También en algunos ganglios intramurales se encontró colocalización VACHT-nNOS aunque la reacción fue más débil para el marcador colinérgico que para el nitrérgico (**Fig. 65 D-F**).

En la lámina propia se registró el mismo patrón de colocalización de VACHT-nNOS que en la capa muscular, en numerosas varicosidades nerviosas (**Fig. 66 A-C**). En la **figura 66 D-F** se muestran a grandes aumentos algunas de estas terminaciones nerviosas finas formadas por varicosidades que contienen ambos neurotransmisores.

b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)

La relación estructural entre las fibras nitrérgicas y adrenérgicas se estudió mediante la inmunofluorescencia doble de TSH-nNOS.

En este caso las imágenes obtenidas tanto de capa muscular como de lámina propia nos mostraron que en algunos puntos existía un alto nivel de colocalización de ambos marcadores, como sucedía en numerosos troncos nerviosos (**Fig. 67 A-C y H**) y en algunos ganglios intramurales (**Figs. 67 I y 68 F**). En otros casos, TSH y nNOS aparecían en fibras separadas que discurrían paralelamente, incluso dentro de un mismo tronco nervioso (**Fig. 67 D-F**), o de forma aislada (**Fig. 68 A-C y G**). Dentro de un mismo ganglio intramural podían encontrarse células de los 3 tipos, sólo inmunorreactivas a TSH, sólo a nNOS y inmunorreactivas a ambos (**Figs. 67 G y I**). También se encontraron casos en los que las fibras adrenérgicas procedían de ganglios positivos a nNOS (**Figs. 68 D-F, H e I**).

En la **figura 69** se puede apreciar esta misma relación estructural entre las fibras nerviosas adrenérgicas y nitrérgicas en imágenes obtenidas mediante microscopía confocal que representan la proyección Z de 65 planos respectivamente (2 μ m cada uno) en una preparación *whole-mount* de capa muscular de trigono de vejiga de hembra SAM-R1. Se aprecia especialmente la íntima relación estructural entre las fibras adrenérgicas y nitrérgicas que discurren paralelas en muchas zonas, así como la colocalización de ambos marcadores en algunas células ganglionares y troncos nerviosos gruesos.

Como material accesorio se adjunta en la **Figura 70** un vídeo donde se aprecia la reconstrucción 3D de 53 planos de 2 μ m cada uno obtenidos con microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de capa muscular de trigono de vejiga de hembra SAM-P8. En el vídeo se puede apreciar la disposición paralela pero muy próxima de numerosas fibras adrenérgicas junto a algunas fibras nitrérgicas rodeando ganglios positivos a nNOS y TSH.

4.2.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs

a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)

La inmunofluorescencia doble de VACHT-vimentina sirvió para estudiar la relación estructural entre los nervios colinérgicos y las ICCs.

A nivel de la lámina propia se observó la presencia de fibras colinérgicas muy próximas a la densa red de ICCs subepiteliales (**Figs. 71 A- C, y 73 A-C y D-F**). Estas ICCs subepiteliales presentan una característica forma estrellada con numerosas prolongaciones finas entrelazadas entre sí y con las células uroteliales. Entre ellas discurren algunas fibras nerviosas colinérgicas de las que se visualizan claramente las varicosidades positivas a VACHT. En algunas ocasiones se observó la disposición perivascular de ambos marcadores rodeando un mismo vaso (**Fig. 71 D-F**). En la **figura 73 D- F** se aprecia la proximidad de las ICCs subepiteliales y sus prolongaciones con las células epiteliales del urotelio, a su vez inmunorreactivas a ACh, junto con terminaciones nerviosas colinérgicas.

En la capa muscular, las ICCs presentan morfología fusiforme con dos prolongaciones largas que se disponen paralelamente a los haces de fibras musculares lisas junto con fibras colinérgicas (**Fig. 71 G-I, J-L y 72 E**). En las imágenes de microscopía confocal (**Fig. 72 A-C**) se aprecia esta distribución de fibras colinérgicas entre una densa red de ICCs fusiformes positivas a vimentina, y a mayores aumentos (**Fig. 72 D**) se observa como las varicosidades nerviosas colinérgicas llegan a contactar

con las ICCs. En la **figura 72 F** se ha insertado como material accesorio un vídeo donde se puede observar la reconstrucción 3D de 10 planos (2 μ m cada uno) obtenidos con microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de capa muscular de trigono de vejiga de macho SAM-P8, en el que se aprecian varios de estos puntos de contacto entre las varicosidades nerviosas y las ICCs. Esporádicamente se observaron ICCs inmunorreactivas a ACh (**Fig. 71 L**).

b) Noradrenalina (TSH)-ICCs (Vimentina)

La inmunofluorescencia doble TSH-vimentina mostró la relación existente entre nervios adrenérgicos intramurales y una densa red de ICCs de forma fusiforme tanto en la capa muscular (**Fig. 74 A-C**) como en la lámina propia (**Fig. 74 D-F**), sin embargo en este caso se encontraron con menor facilidad puntos de contacto entre las terminaciones nerviosas y las ICCs. También aquí apareció colocalización de ambos marcadores en algunas células, sugiriendo por tanto que algunas ICCs poseen la enzima productora de NA (**Figs. 74 C y F**).

4.3. URETRA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 hembras en comparación con SAM-R1

Para investigar las posibles modificaciones inducidas por el envejecimiento en la estructura y funcionalidad de la uretra se utilizó exclusivamente tejido de ratón hembra, por ser esta estructura de más fácil acceso y disección en el caso de la hembra.

4.3.1. Cambios estructurales

La uretra del ratón hembra es una estructura tubular de unos 7-8 mm de longitud, que se extiende desde el cuello vesical hasta el exterior. Bajo una lupa se puede observar cómo la zona proximal de la misma presenta un aspecto claro que se va tornando más rojizo al desplazarse hacia la zona distal; este tono rojizo se corresponde con la presencia creciente de músculo estriado.

El análisis histológico de la uretra se realizó estudiando la zona más proximal a la vejiga, donde la presencia de fibras estriadas es menor y principalmente se observa musculatura lisa. Para ello se realizaron cortes transversales del tejido en ambas estirpes que se tiñeron con H&E y se observaron en el microscopio (**Fig. 75**).

Desde la luz hasta el exterior, en ambos casos, la pared uretral está compuesta de:

- Mucosa o urotelio: constituido por un epitelio plano estratificado, con células de morfología redonda o poligonal dispuestas en varias capas, como ocurría en la vejiga.
- Submucosa o lámina propia: Al igual que la vejiga está compuesta de tejido conjuntivo laxo, con un gran número de vasos sanguíneos.
- Capa muscular lisa: formada por una primera capa longitudinal interna, muy desarrollada, que se extiende desde la submucosa hasta la segunda capa de músculo liso más externa que presenta una disposición circular.
- Capa muscular estriada: Situada en el exterior, rodeando la capa de músculo liso. Esta capa es muy fina en la zona más proximal y va aumentando de grosor gradualmente al aproximarse a la zona distal.
- Serosa o adventicia: Capa más exterior del tubo rodeando la capa muscular y que está formada de tejido conjuntivo laxo y adiposo.

No se observaron diferencias histológicas significativas entre los animales envejecidos y los controles. Así, el grosor tanto de la lámina propia ($138 \pm 39 \mu\text{m}$ $n=4$

en SAM-R1 y $140 \pm 40 \mu\text{m}$ $n=4$ en SAM-P8) como de la capa muscular ($140 \pm 45 \mu\text{m}$ $n=4$ en SAM-R1 y $140 \pm 69 \mu\text{m}$ $n=4$ en SAM-P8) fue similar en ambas estirpes (**Fig. 75**).

4.3.2. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por una alta concentración de K^+ extracelular

La **figura 76** muestra como la administración de una alta concentración de KCl (120 mM) en preparaciones uretrales aisladas no originó una respuesta contráctil diferente entre ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8 ($0,34 \pm 0,02 \text{ mN}$ en SAM-R1 vs $0,29 \pm 0,04 \text{ mN}$ en SAM-P8, $n=16$) indicando que, similarmente a lo que ocurría en la vejiga, la capacidad contráctil del músculo uretral en las ratonas envejecidas tampoco se encuentra alterada.

4.3.3. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por EFS y por agonistas exógenos

En experimentos previos, se observó que en la uretra del ratón hembra las respuestas neurogénicas inducidas por EFS eran de mayor magnitud y reproducibilidad en las preparaciones longitudinales que en las anulares. Por este motivo se utilizaron tiras uretrales en lugar de anillos para estudiar los cambios en las respuestas contráctiles y relajantes.

4.3.3.1. Contracción

4.3.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS

a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8

Las preparaciones fueron preincubadas (30 min) con **L-NOARG** (0,1 mM), y **d-tubocurarina** (0,1 μM) con objeto de eliminar la posible influencia de la liberación de NO de nervios nitrérgicos o la actividad contráctil del músculo estriado mediada por receptores nicotínicos, respectivamente. En estas condiciones, la EFS (1-50 Hz) dio lugar a contracciones bifásicas transitorias del tejido, que consistían en un componente inicial rápido, apreciable a partir de 10-15 Hz, seguido de cierto grado de relajación y la subsiguiente aparición de un componente contráctil más lento que fue observable desde las frecuencias más bajas (**Fig. 77**).

En cada punto de la curva se analizó la amplitud de la respuesta máxima, correspondiente por lo tanto, al componente lento a bajas frecuencias y al rápido a medias y altas. Dicha magnitud fue frecuencia-dependiente, obteniéndose la respuesta

máxima aproximadamente en 50 Hz en ambas estirpes de ratones (**Figs. 77 y 78**) y de amplitud significativamente mayor en los animales envejecidos (**Tabla 9**), no observándose sin embargo diferencias en los valores de EF_{50} (**Tabla 9**). Estos resultados sugieren que con el envejecimiento se produce un incremento en la contractilidad neurogénica uretral, especialmente a las frecuencias medias y altas, en donde predomina el componente rápido de la respuesta.

b) Mediadores implicados

El bloqueo de los receptores α -adrenérgicos con **fentolamina** (0,1 mM; 30 min), redujo la amplitud de la respuesta máxima (E_{max}) en un 60% aproximadamente de la respuesta control en ambas estirpes de ratones (**Figs. 79 y 80; Tabla 9**). Estos resultados muestran que en el ratón SAM-R1 y SAM-P8, la contracción uretral producida por EFS es principalmente adrenérgica. La respuesta residual resistente a fentolamina no fue tampoco inhibida por el bloqueo de los canales de sodio con tetrodotoxina (TTX 1 μ M, 30 min) en ambas estirpes de ratón (**Fig. 80; Tabla 9**), indicando que no es de origen nervioso. Por lo tanto, no se puede descartar la implicación de una estimulación directa de la fibra muscular lisa por el estímulo eléctrico.

4.3.3.1.2. Respuesta contráctil inducida por NA

La adición exógena acumulativa de NA (10^{-8} a 10^{-2} M), originó una contracción dosis-dependiente de las preparaciones uretrales, produciendo una contracción lenta y tónica del tejido que alcanzó su máxima amplitud en 10^{-2} M en ambas estirpes, donde se obtuvo un porcentaje de contracción respecto a KCl (120 mM) que fue significativamente mayor en los animales envejecidos. En cuanto a los valores de pEC_{50} no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, consiguiéndose la mitad de la respuesta máxima entre 10^{-5} y 10^{-6} M en ambos casos (**Figs. 81 y 82; Tabla 10**). Estos resultados revelan que el músculo liso uretral de las ratonas envejecidas presenta hipersensibilidad al neurotransmisor adrenérgico únicamente a las altas concentraciones, en concordancia con lo que ocurría en la estimulación neurogénica.

4.3.3.2. Relajación

Para analizar las respuestas relajantes de la uretra se precisó de la contracción previa del tejido con **AVP** (0,1 μ M), ya que producía una contracción tónica y estable del tejido cuya magnitud, expresada como porcentaje de contracción a KCl (120 mM), no era significativamente diferente en ratones SAM-R1 y SAM-P8 ($590 \pm 62\%$, $n=30$ en SAM-R1 vs $700 \pm 83\%$, $n=30$ en SAM-P8). Además las preparaciones fueron previamente

tratadas con **atropina** (1 μ M) y **guanetidina** (50 μ M) con el fin de reducir la contracción inducida por los mediadores excitatorios ACh y NA, respectivamente.

4.3.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS

a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8

La estimulación eléctrica (1-32 Hz) de las preparaciones, causó relajaciones fásicas transitorias del tejido, que fueron frecuencia-dependientes, cuya máxima amplitud se alcanzó a los 16 Hz tanto en los ratones control como en los envejecidos (**Figs. 83 y 84**). La magnitud de dicha respuesta máxima (E_{max}), expresada como porcentaje de la contracción previa a AVP (0,1 μ M), fue significativamente menor en los animales envejecidos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de EF_{50} (**Tabla 11**). Estos resultados sugieren una posible disfunción en la capacidad relajante del músculo liso uretral con el envejecimiento.

b) Mediadores implicados

La preincubación con **L-NOARG** (0,1 mM; 30 min), redujo las relajaciones inducidas por EFS de forma similar en ambas estirpes de ratones (aproximadamente en un 70% del control), sugiriendo el origen nitrérgico de la relajación neurogénica uretral en ambos casos (**Figs. 85 y 86; Tabla 11**).

4.3.3.2.2. Relajación inducida por DEA/NO

Con el donante de óxido nítrico **DEA/NO** se construyeron curvas dosis-respuesta de relajación en preparaciones uretrales SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con **AVP** (0,1 μ M), con el objetivo de analizar posibles alteraciones en la capacidad de respuesta del músculo liso uretral de los ratones envejecidos al efecto directo de dicho mediador. Las relajaciones dosis-dependientes inducidas por DEA/NO (10^{-8} a 10^{-2} M) fueron lentas y su magnitud no fue significativamente diferente en las preparaciones control y envejecidas, alcanzándose la máxima respuesta en 10^{-2} M en ambos casos (**Figs. 87 y 88**), y con valores de pEC_{50} alrededor de 5 para los dos grupos (**Tabla 12**). Estos datos sugieren que con el envejecimiento no se ve reducida la capacidad del músculo para responder ante el NO.

La inhibición de la enzima guanilato ciclasa con **ODQ** (0,1 mM; 30 min) permitió analizar la participación de esta enzima en la relajación producida por el DEA/NO. Dicho inhibidor, aunque no modificó la magnitud de la respuesta máxima obtenida por la adición acumulativa de DEA/NO (10^{-8} a 10^{-2} M), desplazó de forma significativa la

curva dosis-respuesta hacia la derecha, tanto en SAM-R1 como en SAM-P8, reduciendo el valor de pEC₅₀ entre 1 y 2 órdenes de magnitud (**Figs. 87 y 89; Tabla 12**), confirmando así la participación de cGMP derivado de GC en la respuesta.

4.3.3.2.3. Relajación inducida por Sildenafil

La posible implicación de la PDE5 en la disminución de la relajación neurogénica de la uretra envejecida se investigó mediante la realización de curvas dosis-respuesta con un inhibidor de dicha enzima, el Sildenafil.

La adición exógena acumulativa de **Sildenafil** (10^{-8} a 10^{-3} M) provocó relajaciones lentas en preparaciones uretrales SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con **AVP** (0,1 μ M), que fueron dosis-dependientes, y cuya máxima amplitud, que se obtuvo a la concentración de 10^{-3} M, no fue significativamente diferente entre ambas estirpes de ratones (**Figs. 90 y 91; Tabla 13**). Tampoco en este caso los valores de pEC₅₀ fueron diferentes entre ratones controles y envejecidos (**Tabla 13**). Estos datos parecen excluir a la PDE5 como la responsable de la alteración en la relajación neurogénica uretral de las ratonas SAM-P8.

La preincubación con **ODQ** (0,1 mM; 30 min) desplazó significativamente la curva dosis-respuesta de Sildenafil hacia la derecha, tanto en SAM-R1 como en SAM-P8, sin modificar la magnitud de la respuesta máxima (**Figs. 90 y 92; Tabla 13**), tal y como ocurría con el donante de NO, demostrándose igualmente la mediación de cGMP en la relajación inducida por Sildenafil.

4.3.3.2.4 Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast

a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8

El estudio de la respuesta relajante se completó con un análisis del efecto de una relajación sostenida inducida por EFS de larga duración (4 Hz durante 4 min) o por la adición de DEA/NO (0,1 mM durante 4 min) en presencia de inhibidores de PDEs (IBMX y zaprinast; ambos a 0,1 mM), permitiendo así evitar la degradación del cGMP producido y permitir su acumulación en el tejido. En este apartado se describen las respuestas funcionales correspondientes a los estudios morfológicos de la inmunolocalización de cGMP.

Preparaciones previamente precontraídas con **AVP** (0,1 μ M), y en presencia de **guanetidina** (50 μ M), **atropina** (1 μ M) y **d-tubocurarina** (0,1 μ M), fueron sometidas a EFS continua (4 Hz durante 4 min) o a la adición de DEA/NO (0,1 mM; 4 min) a los 30

s de la adición de los inhibidores de PDE, **IBMX** y **zaprinast** (ambos a 0,01 mM). Hay que señalar, que estos inhibidores de PDE ya originaban por sí solos una relajación de gran magnitud en tan sólo 30 s ($48,9 \pm 9,1\%$, $n=5$ en SAM-R1 y $60,4 \pm 3,9\%$, $n=5$ en SAM-P8) (**Figs. 93 C y 94**). Este efecto enmascara los cambios inducidos por EFS o DEA/NO sobre la amplitud máxima y sólo comparando la pendiente de la relajación de las diferentes respuestas, se evidenciaron diferencias significativas. Así, la velocidad de relajación de las preparaciones control (en presencia de IBMX y zaprinast sólo) de ambas estirpes ($0,3 \pm 0,2$ mN/s en SAM-R1 y $0,4 \pm 0,2$ mN/s en SAM-P8) era significativamente menor que la velocidad de relajación inducida tanto por EFS ($1,0 \pm 0,2$ mN/s en SAM-R1 y $2,4 \pm 0,4$ mN/s en SAM-P8) como por DEA/NO ($1,0 \pm 0,2$ mN/s en SAM-R1 y $2,1 \pm 0,4$ mN/s en SAM-P8) (**Figs. 93 y 95**).

En las preparaciones sometidas a EFS (4Hz, 4 min) después de IBMX y zaprinast (30 s), la relajación del tejido fue de un $24,9 \pm 2,8\%$ ($n=6$) en SAM-R1 y un $24,1 \pm 2,6\%$ en SAM-P8 ($n=6$). La relajación producida por EFS se superpone a la anterior pero es perfectamente distinguible de la misma por un cambio en la pendiente de la curva de relajación (**Fig. 93 B**). El estímulo eléctrico durante 4 min originó una relajación sostenida cuya magnitud no fue significativamente diferente entre los animales control y los envejecidos (**Figs. 93 B y 94**). Así, los valores medios de respuesta máxima fueron de $44,9 \pm 10,7\%$ ($n=6$) para SAM-R1 y $60 \pm 5,1\%$ ($n=6$) para SAM-P8. Sin embargo, cuando se analizó la velocidad de relajación, (dF/dt), los animales envejecidos mostraron valores significativamente mayores ($2,4 \pm 0,4$ mN/s) que los controles ($1,0 \pm 0,2$ mN/s) (**Figs. 93 B y 95**).

En las preparaciones estimuladas con DEA/NO (0,1 mM), las preparaciones mostraban una relajación parcial inducida por **IBMX** y **zaprinast** de valor similar al indicado para las preparaciones estimuladas por EFS ($30,0 \pm 6\%$, $n=6$ en SAM-R1 y $29,4 \pm 4,8\%$, $n=6$ en SAM-P8). La estimulación con DEA/NO durante 4 min originó una relajación sostenida que también fue similar en ambas estirpes de ratones, alcanzando un valor de un $57,5 \pm 5,6\%$ ($n=6$) en SAM-R1 y de un $59,4 \pm 3,1\%$ ($n=6$) en SAM-P8 (**Figs. 93 A y 94**). Sin embargo, y al igual que ocurría con la estimulación eléctrica, la pendiente de la respuesta fue significativamente mayor en las preparaciones uretrales envejecidas ($1,0 \pm 0,2$ mN/s en SAM-R1 y $2,1 \pm 0,4$ mN/s en SAM-P8) (**Figs. 93 A y 95**). Estos resultados sugieren la aparición de algún cambio asociado al envejecimiento que lleva a una relajación dependiente de NO/cGMP más rápida.

b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)

El pretratamiento con **ODQ** (0,1 mM; 30 min) en preparaciones uretrales SAM-R1, redujo significativamente la amplitud de la respuesta relajante de larga duración (4 min) inducida por DEA/NO (0,1 mM) en un 25% aproximadamente. Así, se obtuvieron

valores de relajación en presencia de ODQ de un $32,5 \pm 7,9\%$ (n=4) frente al $57,5 \pm 5,6\%$ (n=4) que se obtenía en ausencia del inhibidor. Sin embargo en las preparaciones SAM-P8 el ODQ no fue capaz de reducir significativamente dicha respuesta ($41,8 \pm 9,7\%$, n=4 en presencia de ODQ vs $59,4 \pm 3,1\%$, n=4 en ausencia de ODQ) (**Figs. 96 A y 97**). No obstante, en ambas estirpes la pendiente (dF/dt) de las respuestas inducidas por DEA/NO se vieron reducidas significativamente por la preincubación con ODQ tanto en SAM-R1 ($1,0 \pm 0,2$ mN/s frente a $0,22 \pm 0,1$ mN/s, n=4) como en SAM-P8 ($2,1 \pm 0,4$ mN/s frente a $0,19 \pm 0,1$ mN/s, n=4) (**Figs. 96 A y 98**), comprobándose en ambas estirpes la participación de cGMP en las respuestas relajantes inducidas por DEA/NO.

El nivel de relajación inducido por EFS (4 Hz, 4 min) en preparaciones SAM-R1 y SAM-P8 tratadas con **ODQ** o **L-NOARG** (ambos a 0,1 mM; 30 min) tampoco fue diferente del obtenido en las no tratadas. Así pues, las respuestas en presencia de ODQ fueron de $58,3 \pm 6,2\%$ (n=4) para los animales control y de $61,6 \pm 7,4\%$ (n=4) para los envejecidos, y en presencia de L-NOARG de $55,1 \pm 20,9\%$ (n=4) en SAM-R1 y $41,6 \pm 7,6\%$ (n=4) en SAM-P8 (**Figs. 96 B-C y 97**). No obstante también en este caso la velocidad de estas respuestas fue más lenta que la obtenida en las preparaciones sometidas a EFS sin inhibidores, obteniéndose unos valores medios de pendiente ($0,32 \pm 0,1$ mN/s para SAM-R1 y $0,52 \pm 0,1$ mN/s para SAM-P8 en presencia de ODQ, y $0,44 \pm 0,3$ mN/s para SAM-R1 y $0,50 \pm 0,2$ mN/s para SAM-P8 en presencia de L-NOARG) que son significativamente menores que la pendiente producida en las preparaciones no tratadas (**Figs. 96 B-C y 98**). Por lo tanto, se puede concluir que en ambas estirpes la relajación de larga duración inducida por EFS es fundamentalmente nitrérgica (debida a la activación de NOS) y que además se produce por la activación de la GC y la consiguiente acumulación de cGMP.

4.3.4. Cambios en la densidad de innervación uretral

4.3.4.1. Innervación colinérgica

Las imágenes representativas de inmunofluorescencia a VACHT en preparaciones *whole-mount* de capa muscular y lámina propia de la uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 se muestran en las **figuras 99 y 100** respectivamente. Se observa como los nervios colinérgicos aparecen como terminaciones nerviosas muy finas formadas por numerosas varicosidades. Éstas se pueden observar en imágenes a mayores aumentos en las **figuras 101 D y 102 B, C y D**. Se observaron también numerosas placas motoras inmunorreactivas a VACHT, que se concentraban principalmente en la zona medial innervando el músculo estriado presente en el tejido (**Figs. 99-100 C**); algunas de estas placas motoras se pueden observar en detalle en la **figura 101 A y B**. También apareció ocasionalmente reactividad a VACHT en vasos sanguíneos, supuestamente localizada en el endotelio (**Fig. 101 C**), así como algunos ganglios intramurales formados por un

número variable de células que se localizaban generalmente en la zona proximal (**Fig. 101 E y F**). En la lámina propia la distribución de las fibras se presentó con una disposición similar a la encontrada en la capa muscular. En esta capa cabe mencionar la aparición ocasional de inmunorreactividad a VACHT en algunas células cuya morfología sugiere que pudieran tratarse de ICCs conteniendo el neurotransmisor colinérgico (**Fig. 102 A**). No se observó inmunorreactividad en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (resultados no mostrados).

Los resultados de la cuantificación de inmunorreactividad a VACHT en la uretra se presentan en la **figura 103**, donde se observa una distribución bastante homogénea en todas las regiones tanto de la capa muscular como de la lámina propia. Solamente se observó una ligera reducción significativa de la innervación en la zona medial, zona en la que predomina la aparición de las placas motoras. Por último destacar que no se observaron diferencias significativas entre los animales control y envejecidos en ninguna de las capas. Estos datos indican que, a diferencia de la vejiga, en la uretra de las hembras no se dan alteraciones aparentes de la innervación colinérgica durante el envejecimiento.

4.3.4.2. Innervación nitrérgica

En las **figuras 104 y 105** se pueden observar las imágenes representativas de inmunodetección de nNOS en preparaciones *whole-mount* de capa muscular y lámina propia de la uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 respectivamente. La innervación nitrérgica en la uretra fue abundante en todas sus regiones, presentándose como una densa red de terminaciones nerviosas finas reunidas frecuentemente en forma de pequeños troncos nerviosos, que en la capa muscular se disponían siguiendo el curso de los haces musculares en algunos casos (**Figs. 104-105 A, C y E**), o bien se presentaban con numerosas ramificaciones dispuestas irregularmente como sucedía en la lámina propia. En contacto con estos troncos nerviosos aparecieron habitualmente ganglios intramurales inmunorreactivos a nNOS, localizados en su mayoría en la zona proximal y compuestos por un número pequeño o grande de células según el caso (**Fig. 106 y 107 A-C-D**).

Los resultados de cuantificación de densidad nitrérgica en la uretra se muestran en la **figura 108**. Se observa que mientras en la capa muscular de ambas estirpes la innervación nitrérgica se caracterizó por presentar una distribución homogénea a lo largo de toda la uretra, en la lámina propia apareció una mayor densidad de innervación en la zona medial que se extendió en las envejecidas también a la zona distal (**Figs. 104-105 B, D y F**). Por otra parte, destaca la existencia de importantes diferencias entre los animales envejecidos y control, dándose en primer lugar una densidad de innervación nitrérgica mucho más alta en la zona medial, y sobretodo distal, de la lámina propia de las hembras

envejecidas, encontrando sin embargo lo contrario en la capa muscular, donde la densidad de innervación en SAM-P8 fue significativamente menor que en SAM-R1, en este caso en las regiones proximal y medial. Estos datos parecen indicar que durante el envejecimiento en la lámina propia de la uretra se produce un aumento de innervación nitrérgica, tal y como sucedía en la vejiga, mientras que en la capa muscular la tendencia sería la contraria, produciéndose una denervación que estaría en consonancia con la disminución de respuesta relajante neurogénica observada en los estudios funcionales.

4.3.4.3. Innervación adrenérgica

Los resultados del estudio de inmunorreactividad a TSH en la uretra mostraron una intensa innervación adrenérgica que se distribuyó de forma uniforme a lo largo de todas las capas del tejido (**Figs. 109 y 110**), manifestándose en forma de pequeños troncos o delgadas terminaciones nerviosas que generalmente se disponían siguiendo un trayecto sinuoso, aunque en la capa muscular se las podía observar discurriendo paralelamente a las fibras musculares. En las **figuras 111-112 D** se muestran en detalle a mayores aumentos algunas de estas terminaciones nerviosas, donde se pueden apreciar las pequeñas varicosidades que las forman. Asociados a los troncos nerviosos o de forma independiente se localizaron ocasionalmente pequeños ganglios intramurales en las distintas zonas (**Figs. 111 y 112 B y C**). Además y de forma similar a lo que ocurría en la vejiga, en la lámina propia de la uretra aparecieron numerosos nervios adrenérgicos con disposición perivascular, especialmente en la zona proximal (**Fig. 112 A**).

En la **figura 113** se muestran los resultados de cuantificación de la inmunorreactividad a TSH en la uretra. Se observa en primer lugar la densa y uniforme innervación adrenérgica en todas las regiones de la capa muscular y lámina propia. Aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre animales SAM-R1 y SAM-P8 en ninguna de las regiones, si se observa una tendencia a disminuir la innervación adrenérgica en la mayoría de las zonas de la uretra en las ratonas envejecidas.

4.3.5. Cambios en la densidad de ICCs uretrales

4.3.5.1. Densidad de ICCs positivas a vimentina

Las imágenes representativas de inmunofluorescencia a vimentina en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular y la lámina propia de la uretra SAM-R1 (**Fig. 114**) confirman la gran densidad de ICCs presentes en la uretra del ratón hembra normal, y del ratón hembra envejecido (**Fig. 115**). En todas las regiones del tejido se apreció la presencia de una densa red de ICCs que se mostraron interconectadas entre sí por sus largas prolongaciones, especialmente en la capa de la lámina propia, donde aparecieron

indistintamente en su forma estrellada o fusiforme (**Figs. 114 B-D-F y 117**). En la capa muscular en cambio, se las encontró mayormente en la forma fusiforme (**Fig. 116**) discurriendo en la misma dirección y muy próximas a las fibras musculares lisas, aunque también se las observó rodeando a las fibras estriadas en algunas ocasiones (**Fig. 116 D**). En las **figuras 116 y 117** se muestran en detalle algunas ICCs uretrales donde destaca un gran núcleo central con escaso citoplasma del que parten dos o más prolongaciones.

La cuantificación de la inmunorreactividad a vimentina en la uretra (**Fig. 118**) permite observar una densidad de ICCs similar a lo largo de toda la longitud de la uretra, tanto en capa muscular como en lámina propia, aunque aumentando ligeramente los valores de densidad al acercarnos a la zona distal. Por lo que concierne a diferencias entre estirpes, destaca una disminución en la densidad de ICCs de la capa muscular de las ratonas SAM-P8 con respecto a las controles, sin producirse alteraciones en la densidad celular de la lámina propia.

4.3.6. Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la uretra de ratones hembra SAM-P8 en comparación con SAM-R1

La **figura 119** muestra como la lámina propia de la uretra envejecida únicamente sufre un aumento significativo en la densidad de innervación nitrérgica, sin alterarse en este caso los valores de innervación colinérgica y de densidad de ICCs con el envejecimiento, a diferencia de lo descrito en la vejiga. Los resultados de inmunorreactividad de la capa muscular revelan alteraciones en la uretra de las hembras SAM-P8 que no se detectaron en la vejiga, como es una importante disminución en la innervación nitrérgica y en la densidad de ICCs.

4.3.7. Cambios en la inmunorreactividad a cGMP

En este estudio la inmunolocalización de cGMP se realizó en preparaciones uretrales de ratón normal y envejecido sometidas a la adición exógena de DEA/NO, con el fin de determinar la localización de este nucleótido, y evaluar el posible efecto del envejecimiento sobre las cantidades acumuladas del mismo durante la respuesta relajante.

4.3.7.1. cGMP inducido por la adición exógena de DEA/NO

En las preparaciones uretrales SAM-R1 y SAM-P8 sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM), en presencia de IBMX y zaprinast (ambos a 0,1 mM), destacó la aparición de abundantes ICCs inmunorreactivas a cGMP, tanto en lámina propia como

en capa muscular, que estaban agrupadas formando redes interconectadas entre sí que destacaban fuertemente del fondo menos reactivo (**Figs. 120 y 121**). A pequeños aumentos se pueden diferenciar fácilmente las ICCs como los elementos del tejido más abundante e intensamente marcados por cGMP. Se aprecia como las ICCs del músculo adoptan una posición paralela a los haces musculares en algunos casos (**Fig. 120 C y 121 A-C**). A mayores aumentos se observa que la morfología de las ICCs inmunorreactivas es similar a la descrita en el capítulo anterior, apareciendo en la capa muscular principalmente con forma fusiforme (**Fig. 122 C-D-E-F-H**), aunque localizándose también ocasionalmente ICCs estrelladas (**Fig. 122 B**), mientras que en la lámina propia se presentan igualmente células de los dos tipos (**Fig. 123 B-C-E-F-G-H**), destacándose la presencia de ICCs inmunorreactivas a cGMP localizadas a nivel suburotelial (**Fig. 123 H**). No obstante las ICCs no fueron las únicas estructuras marcadas con cGMP, apareciendo también en el músculo estriado o en una posible red de pericitos en la pared de los vasos sanguíneos (**Fig. 122 A y 123 I**). Apareció además marcaje a cGMP en algunos troncos nerviosos (**Fig. 122 G**) e incluso en ganglios intramurales (**123 A-D**).

Al analizar la densidad de inmunorreactividad a cGMP en ambos grupos (**Fig. 124**) se observó una densidad de marcaje uniforme y similar en ambas estirpes de ratones a lo largo de todas las regiones de la uretra. Solamente se observó una densidad de cGMP significativamente menor en la zona distal de la uretra SAM-P8, tanto en capa muscular como en lámina propia.

4.3.7.2. Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa con ODQ

En preparaciones estimuladas con DEA/NO (0,1 mM) en presencia del inhibidor de la guanilato ciclasa (0,1 mM) se produjo una inhibición casi completa del marcaje a cGMP en todas las regiones uretrales de ambas estirpes de ratones (**Figs. 125-126 B y D**), no pudiéndose diferenciar en ningún caso poblaciones de ICCs inmunorreactivas al nucleótido. En las **figuras 127 y 128** se observa la drástica disminución de inmunorreactividad a cGMP en ambas capas de las preparaciones incubadas con ODQ con respecto a las estimuladas en ausencia del inhibidor. No se observaron diferencias en cuanto a la inhibición de la inmunorreactividad entre los animales SAM-P8 y SAM-R1.

4.3.7.3. Inmunorreactividad control en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas

Las **figuras 129 y 130** muestran imágenes representativas de la inmunorreactividad a cGMP en la capa muscular y lámina propia de preparaciones uretrales SAM-R1 y SAM-P8 estimuladas exclusivamente con IBMX y zaprinast (ambos a 0,1 mM), en las que se observa una intensidad de marcaje claramente menor a la de las preparaciones estimuladas adicionalmente con DEA/NO. La cuantificación del marcaje a cGMP en

estas condiciones se muestra en las **figuras 131 y 132** donde se aprecia la baja inmunorreactividad a cGMP en las preparaciones estimuladas con IBMX y zaprinast en comparación con la provocada por la presencia adicional de DEA/NO. También se puede observar por otra parte, que la inmunorreactividad producida por los inhibidores de las PDEs en ambas capas es similar en ambas estirpes de ratones, excepto un menor marcaje en la zona muscular distal de la uretra envejecida.

4.3.8. Estudios de colocalización en la uretra

4.3.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales

a) Acetilcolina (VChT)- NO (nNOS)

Como ocurrió en la vejiga, el doble marcaje de VChT y nNOS en preparaciones *whole-mount* de capa muscular y lámina propia de uretra de hembra SAM-R1 y SAM-P8 demostró la colocalización del neurotransmisor colinérgico y nitrérgico en numerosas varicosidades nerviosas y en ganglios intramurales (**Fig. 133 C**), algunos ejemplos de los cuales se muestran en detalle a grandes aumentos en la **figura 133 F, G y H**. Aunque tampoco en este caso la colocalización de los marcadores fue total, apareciendo a menudo fibras colinérgicas no inmunorreactivas a nNOS (**Fig. 133 B-C**).

b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)

La relación estructural entre las fibras nitrérgicas y adrenérgicas de la uretra siguió un patrón de colocalización muy similar al de la vejiga. En las imágenes obtenidas de la capa muscular (**Fig. 134**) se ve que aunque existe un alto nivel de colocalización de ambos marcadores en numerosos ganglios intramurales (**Fig. 134 C-F-G-J-K-L**), y en algunos troncos nerviosos (**Fig. 134 C**), las terminaciones nerviosas finas aparecen normalmente como fibras separadas, que en ocasiones pueden discurrir de forma paralela dentro del mismo tronco nervioso o de forma aislada (**Fig. 134 C-F-G-K-I**). En las imágenes de la lámina propia se confirmó esta disposición de los nervios, ya que aunque se observó a pequeños aumentos aparente colocalización en algunas terminaciones nerviosas pero no en otras (**Fig. 135 C**), a mayores aumentos se distinguió claramente como los marcadores se localizaban en nervios independientes que discurrían estrechamente relacionados entre sí (**Fig. 135 F**).

En la **figura 136 A-C, D y E** se puede observar la ausencia total de colocalización de ambos marcadores en la densa red de nervios intramurales de la submucosa en imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, y que representan la proyección Z de 41 (**A-C**) y 17 (**D y E**) planos de 2 μm cada uno de una preparación *whole-mount* de la zona proximal de la lámina propia de una hembra SAM-R1.

Como material accesorio además se adjunta en la **figura 136 F** un vídeo donde se puede visualizar la reconstrucción 3D de 33 de los 41 planos que conforman la imagen fija **136 C**.

4.3.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs

a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)

En la uretra, la inmunofluorescencia doble de VACHT-vimentina mostró numerosos puntos de contacto entre las ICCs fusiformes de la capa muscular y la red de nervios colinérgicos que existe en la misma (**Fig. 137 A-C**), los cuales se observaron en múltiples ocasiones discurriendo de forma paralela a las largas prolongaciones de las células intersticiales (**Fig. 137 G y 137 D-F y H**), disposición que recuerda a lo encontrado en la vejiga.

b) Noradrenalina (TSH)- ICCs (Vimentina)

Las imágenes obtenidas de los estudios de inmunofluorescencia doble de TSH-vimentina en la uretra (**Fig. 138 A-C, D-F, G y H**) reiteran los resultados que se obtuvieron en la vejiga, es decir, aunque existen puntos de contacto entre la innervación adrenérgica y las ICCs fusiformes presentes en la uretra, éstos son más difíciles de encontrar que en el caso anterior, y en muchas ocasiones estos puntos de contacto se deben a la disposición perivascular de ambos marcadores rodeando a un mismo vaso (**Fig. 138 A-C y H**). Además se ha evidenciado la posible presencia de la enzima sintetizadora de NA en algunas ICCs (**Fig. 138 A y C**).

4.3.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP

Para determinar si las células inmunorreactivas a cGMP eran en efecto ICCs se realizó la inmunofluorescencia doble cGMP-vimentina en las preparaciones uretrales SAM-R1 y SAM-P8 sometidas al tratamiento previo con DEA/NO. Las imágenes obtenidas, tanto de lámina propia como de capa muscular, mostraron colocación clara de ambos marcadores en numerosas ICCs, sin embargo no todas las células positivas a vimentina lo fueron para cGMP y viceversa (**Figs. 139 A-C y D, 140 A-C, 141 A-C, E y P, y 142 A-C y D**).

Se considera de forma general que cuando ambos marcadores colocan deben dar lugar a un color amarillo como consecuencia de la superposición de las imágenes verde y roja, no obstante al observar a grandes aumentos algunas ICCs, se apreció que generalmente el marcaje de vimentina era más periférico tanto en el cuerpo celular como

en las prolongaciones, mientras que el marcaje de cGMP se localizaba principalmente en el citoplasma (**Figs. 139 E, 140 H y 141 C, E y F**), lo que puede originar una falta aparente de colocalización. En otras ocasiones se detectaron células donde los dos marcadores colocalizaban intensamente en el citoplasma celular (**Fig. 142 E, F y G**). Cabe destacar que la colocalización predominó en ICCs bipolares, algunas con largas prolongaciones que a veces aparecían paralelas a las fibras musculares lisas positivas a cGMP (**Fig. 140 H**), e incluso se las observó envolviendo a fibras estriadas (**Fig. 140 D-F**). En la lámina propia también se observó la disposición de ICCs subepiteliales de forma estrellada cuyas prolongaciones eran inmunorreactivas a cGMP y vimentina (**Fig. 141 D**).

En las **figuras 143 A-C, 144 A-E, 145 A-C, 146 y 147** se observan imágenes obtenidas mediante microscopía confocal que muestran la proyección Z de un número variable de planos de 2 μ m de diversas preparaciones uretrales SAM-R1 y SAM-P8, donde se observan las mismas características de colocalización descritas más arriba. En las **figuras 143 A-C y 146** se muestran a grandes y pequeños aumentos respectivamente ICCs bipolares de la capa muscular donde colocalizan ambos marcadores, mientras que en la **figura 144** se observan ICCs únicamente positivas a vimentina que poseen largas prolongaciones colocadas paralelamente entre las células musculares lisas (**A-C**). En esta misma figura también se muestran imágenes donde las ICCs que se marcan con vimentina no lo hacen con cGMP y viceversa (**D y E**). En las fotografías de lámina propia (**Fig. 145 A-C y 147**) se aprecia como ICCs estrelladas situadas subepitelialmente, que únicamente se marcan con vimentina, se encuentran en estrecho contacto con las células del urotelio que por el contrario sí son positivas a cGMP.

Como material accesorio en las **figuras 143 D y 145 D** se adjuntan las reconstrucciones 3D de 17 y 14 planos respectivamente (2 μ m cada uno) de algunas de las preparaciones donde se realizaron fotografías con microscopía confocal.

4.4. CUERPO CAVERNOSO: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1

4.4.1. Cambios estructurales

El pene del ratón está integrado por tres columnas de tejido eréctil, dos cuerpos cavernosos que nacen en la región isquiopubiana y que se sitúan dorsolateralmente, y uno esponjoso que conforma el tubo de la uretra y que está situado en la zona ventral. Analizando cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 teñidos con H&E, se observó como los cuerpos cavernosos de ambas estirpes presentaron numerosos espacios lacunares de morfología variable e irregular, confiriendo un aspecto esponjoso al tejido, los cuales se encuentran revestidos por una capa de endotelio a la que le siguen múltiples trabéculas de músculo liso dispuestas irregularmente y que están embebidas en una matriz de colágeno y fibras elásticas. Entre estas últimas fue frecuente encontrar vasos sanguíneos situados muy próximos a los espacios lacunares. Todo el conjunto está rodeado externamente por la túnica albugínea, una capa de tejido conjuntivo laxo que también contiene numerosos vasos sanguíneos (**Fig. 148**).

En los animales envejecidos los espacios lacunares eran de un diámetro claramente mayor ($130 \pm 43 \mu\text{m}$, $n=4$) en comparación con los animales SAM-R1 ($50 \pm 25 \mu\text{m}$, $n=4$), hecho que podría estar alterando las propiedades hemodinámicas y mecánicas del tejido y por tanto la funcionalidad del pene.

4.4.2. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por una alta concentración de K^+ extracelular

En preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso la aplicación de una alta concentración de KCl (120 mM) produjo una contracción lenta del tejido cuyo valor máximo de amplitud no fue significativamente diferente entre ratones SAM-R1 y SAM-P8 ($0,49 \pm 0,04 \text{ mN}$ en SAM-R1 *vs* $0,40 \pm 0,05 \text{ mN}$ en SAM-P8, $n=18$), indicando que la capacidad contráctil del músculo trabecular no se encuentra deteriorada en los ratones SAM-P8 (**Fig. 149**).

4.4.3. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por EFS y por agonistas exógenos

4.4.3.1. Contracción

4.4.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS

a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8

La estimulación eléctrica transmural (1-50 Hz) de preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso originó contracciones fásicas transitorias del tejido, cuya magnitud fue frecuencia-dependiente, alcanzando su respuesta máxima (E_{\max}) a 45 Hz aproximadamente en ambas estirpes de ratones (**Figs. 150 y 151**). Destaca la aparición de una potenciación de la contracción, especialmente a frecuencias altas, en ratones envejecidos, con un aumento significativo en los valores de E_{\max} . Los valores de EF_{50} fueron sin embargo mayores en SAM-P8 debido al considerable aumento del efecto máximo (**Tabla 14**). Estos resultados sugieren que la sensibilidad del músculo liso trabecular a la estimulación neurogénica se ve incrementada por el envejecimiento mostrando hipercontractilidad a las frecuencias más altas.

b) Mediadores implicados

En las preparaciones de cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8 el bloqueo de los receptores α -adrenérgicos con **fentolamina** (10 μ M, 30 min) provocó una inhibición significativa de la curva frecuencia-respuesta de contracción (1-50 Hz) que redujo el efecto máximo (E_{\max}), alcanzado a 50 Hz, entre un 70-80% de la respuesta control en ambas estirpes (**Figs. 152 y 153; Tabla 14**), indicando el predominio adrenérgico de la respuesta contráctil neurogénica del cuerpo cavernoso del ratón.

4.4.3.1.2. Respuesta contráctil inducida por NA

En el cuerpo cavernoso la adición exógena acumulativa de NA (10^{-8} a 10^{-2} M) originó una contracción tónica dosis-dependiente, que alcanzó la máxima amplitud a la dosis de 10^{-3} M en ambas estirpes de ratones, obteniéndose unos valores de E_{\max} que no eran significativamente diferentes entre animales controles y envejecidos. Sin embargo se observó un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-respuesta con el envejecimiento, obteniéndose un valor de pEC_{50} en SAM-P8 que era significativamente menor que el de SAM-R1 (**Figs. 154 y 155; Tabla 15**). Estos datos parecen indicar una disminución de sensibilidad a la contracción inducida por NA del músculo liso, por lo que la mayor contractilidad neurogénica no parece proceder de una mayor sensibilidad postsináptica a la NA.

4.4.3.2. Relajación

Para analizar las respuestas relajantes del cuerpo cavernoso se precisó en este caso de la contracción previa del tejido con **NA** (50 μ M), ya que en estas preparaciones éste era el agente que producía la contracción más estable y de mayor magnitud, cuya amplitud además expresada como porcentaje de contracción a KCl (120 mM), no era significativamente diferente en ratones SAM-R1 y SAM-P8 ($167,4 \pm 14,9$ %, $n=30$ en SAM-R1 vs $199,7 \pm 14,3$ %, $n=30$ en SAM-P8).

4.4.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS

a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8

En presencia de **atropina** (1 μ M) y **guanetidina** (50 μ M) la EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso precontraídas con **NA** (50 μ M) originó relajaciones transitorias fásicas del tejido que eran frecuencia-dependientes, y cuyo valor máximo fue alcanzado a 16 Hz en ambos grupos (**Figs. 156 y 157; Tabla 16**). Tampoco hubo diferencia en los valores de EF_{50} de ambas curvas (**Tabla 16**), sugiriendo que la relajación neurogénica del cuerpo cavernoso no se modifica de forma significativa con el envejecimiento.

b) Mediadores implicados

La inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa con **L-NOARG** (0,1 mM; 30 min) en preparaciones de cuerpo cavernoso incubadas con **atropina** (1 μ M) y **guanetidina** (50 μ M) y contraídas con **NA** (50 μ M) redujo significativamente la respuesta relajante inducida por EFS (1-32 Hz), disminuyendo la amplitud de la E_{max} de ambas estirpes alrededor de un 70% de la respuesta control, demostrándose así el origen predominantemente nitrérgico de esta relajación (**Figs. 158 y 159; Tabla 16**).

4.4.3.2.2. Respuesta relajante inducida por DEA/NO

La adición exógena acumulativa de **DEA/NO** (10^{-8} a 10^{-2} M) en las preparaciones de cuerpo cavernoso precontraídas con **NA** (50 μ M) originó una relajación tónica dosis-dependiente del tejido, cuya máxima respuesta se obtuvo en 10^{-3} M tanto en SAM-R1 como en SAM-P8. La amplitud de la respuesta máxima de los ratones envejecidos, expresada como porcentaje de la contracción previa, fue semejante a la que se obtuvo en los animales control, sin embargo se produjo un desplazamiento hacia la derecha estadísticamente significativo de la curva dosis-respuesta en los ratones SAM-P8, sugiriendo una posible pérdida de sensibilidad del músculo liso trabecular al

neurotransmisor nitrérgico con el envejecimiento, que sin embargo no se detectó en la curva de estimulación eléctrica (**Figs. 160 y 161; Tabla 17**).

La preincubación del tejido con **ODQ** (0,1 mM) 30 minutos antes de la contracción con **NA** (50 μ M) no inhibió la magnitud de la respuesta máxima de las curvas dosis-respuesta de **DEA/NO** (10^{-8} a 10^{-2} M) en ninguna de las estirpes, no obstante desplazó la curva hacia la derecha, reduciéndose el valor de pEC_{50} en presencia de **ODQ** en más de un orden de magnitud (**Figs. 160 y 162; Tabla 17**) en ambos grupos de animales, y comprobándose que en el cuerpo cavernoso, la relajación inducida por el **DEA/NO** es específica de cGMP.

4.4.3.2.3. Respuesta relajante inducida por Sildenafil

Para determinar si la disminución en la sensibilidad del cuerpo cavernoso de los animales SAM-P8 al donante de **NO** exógeno era debido a una alteración en la expresión o en la actividad de la **PDE5** se llevaron a cabo curvas dosis-respuesta con **Sildenafil** en preparaciones de ambas estirpes.

La adición exógena acumulativa de **Sildenafil** (10^{-8} a 10^{-3} M) en el cuerpo cavernoso provocó relajaciones tónicas en preparaciones precontraídas con **NA** (50 μ M), que fueron dosis-dependientes, y cuya máxima amplitud, que se obtuvo a la concentración de 10^{-3} M, no fue significativamente diferente entre ambas estirpes de ratones cuando se expresó como porcentaje de la contracción previa (**Figs. 163 y 164; Tabla 18**). Tampoco los valores de pEC_{50} fueron diferentes entre ratones controles y envejecidos (**Tabla 18**), por lo tanto se puede descartar a la **PDE5** como la responsable de dicha disfunción.

La preincubación con **ODQ** (0,1 mM; 30 min) desplazó significativamente la curva dosis-respuesta de **Sildenafil** hacia la derecha, tanto en SAM-R1 como en SAM-P8, sin modificar la magnitud de la respuesta máxima (**Figs. 163 y 165; Tabla 18**) demostrándose una vez más que la relajación inducida por el **Sildenafil** es debida a la acumulación de cGMP en el tejido.

4.4.3.2.4. Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast

a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8

El análisis del efecto de la estimulación de larga duración con **EFS** o **DEA/NO** reveló respuestas relajantes del tejido eréctil tanto control como envejecido que fueron muy similares a las encontradas en la uretra, y que se detallan a continuación.

Las preparaciones de cuerpo cavernoso precontraídas con **NA** (50 μ M), y en presencia de **guanetidina** (50 μ M) y **atropina** (1 μ M), respondieron a la adición de los inhibidores de PDE, **IBMX** y **zaprinast** (ambos a 0,01 mM), con una relajación parcial del tejido cuyo valor medio de amplitud fue de $21,8 \pm 1,9\%$ (n=7) en SAM-R1 y $18,9 \pm 2,2\%$ en SAM-P8 (n=7) de la precontracción con NA. Como en la uretra, la relajación producida por EFS, a los 30 s de la adición de los inhibidores de PDE, se superpuso a la producida por éstos, aunque un cambio en la pendiente de la curva de relajación ante la aplicación del estímulo eléctrico permitió diferenciar ambos fenómenos (**Fig. 166 A**). La estimulación eléctrica continuada del cuerpo cavernoso originó relajaciones sostenidas del tejido cuya magnitud a los 4 min fue similar en ambas estirpes de ratones (**Figs. 166 A y 167**), obteniéndose unos valores medios de amplitud respecto a la NA de $73,8 \pm 5,1\%$ (n=6) en SAM-R1 y $73,9 \pm 1,9\%$ (n=6) en SAM-P8. No obstante, al analizar la pendiente de las respuestas (dF/dt), se observó que en los animales envejecidos ésta era significativamente mayor ($2,7 \pm 0,5$ mN/s) en comparación con los controles ($0,8 \pm 0,1$ mN/s) (**Figs. 166 A y 168**).

Para la estimulación de larga duración con **DEA/NO** (0,1 mM) en el cuerpo cavernoso, el agonista se añadió a los 30 s de la adición de los inhibidores de PDE y estuvo presente durante 4 min en preparaciones precontraídas con **NA** (50 μ M). La relajación previa inducida por **IBMX** y **zaprinast** (ambos a 0,01 mM) fue similar a la indicada para las preparaciones estimuladas por EFS ($19,6 \pm 3,9\%$, n=6 en SAM-R1 y $20,5 \pm 3,0$, n=6 en SAM-P8). El DEA/NO por su parte produjo una relajación sostenida de la preparación cuyo valor de amplitud a los 4 min no fue significativamente diferente entre ambas estirpes de ratones ($69,0 \pm 5,4\%$, n=6 en SAM-R1 y $78,8 \pm 3,0\%$, n=6 en SAM-P8) (**Figs. 166 B y 167**). La velocidad de las respuestas no llegó a alcanzar en este caso la significación estadística siendo en los animales envejecidos de $0,8 \pm 0,2$ mN/s y de $0,56 \pm 0,1$ mN/s en los controles (**Figs. 166 B y 168**).

Por último las relajaciones tónicas producidas por la aplicación exclusiva de **IBMX** y **zaprinast** en estas preparaciones (ambos a 0,01 mM durante 4 min), tampoco presentaron una amplitud significativamente diferente ($66,3 \pm 3,5\%$, n=5 en SAM-R1 y $73,7 \pm 6,8\%$, n=5 en SAM-P8) de las producidas por EFS o DEA/NO, aunque las respuestas fueron más lentas con valores de la pendiente significativamente menores ($0,21 \pm 0,1$, n=5 en SAM-R1 y $0,27 \pm 0,1$, n=5 en SAM-P8) que en las preparaciones estimuladas (**Figs. 166 C y 168**).

b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)

El pretratamiento con **ODQ** (0,1 mM; 30 min) en las preparaciones de cuerpo cavernoso, no redujo significativamente la amplitud de la respuesta relajante de larga

duración (4 min) inducida por **DEA/NO** (0,1 mM) en presencia de IBMX y zaprinast en ninguna de las dos estirpes, obteniéndose unos valores de relajación que fueron de $61,6 \pm 3,1\%$ (n=4) en SAM-R1, y de $60,5 \pm 6,3\%$ (n=4) en SAM-P8 (**Figs. 166-169 A y 170**). Sin embargo, la pendiente (dF/dt) de estas respuestas ($0,16 \pm 0,1$ mN/s en SAM-R1 y $0,26 \pm 0,1$ mN/s en SAM-P8) fue significativamente menor que la de las respuestas obtenidas en ausencia del ODQ ($0,56 \pm 0,1$ mN/s en SAM-R1 y $0,8 \pm 0,2$ mN/s en SAM-P8), demostrándose la participación de la activación de la GC en las mismas (**Figs. 166-169 A y 171**).

En preparaciones estimuladas con EFS (4 Hz, 4 min) y preincubadas con **ODQ** o **L-NOARG** (ambos a 0,1 mM; 30 min) la respuesta relajante alcanzó una amplitud a los 4 min que fue similar a la obtenida en las preparaciones estimuladas eléctricamente sin inhibidores. Así pues, las respuestas en presencia de ODQ fueron de $57,7 \pm 5,7\%$ (n=4) para los animales control y de $68,2 \pm 7,8\%$ (n=4) para los envejecidos, y en presencia de L-NOARG de $53,9 \pm 13,5\%$ (n=4) en SAM-R1 y $62,2 \pm 12,4\%$ (n=4) en SAM-P8 (**Figs. 166 B, 169 B-C y 170**). Estos valores de relajación una vez más se pueden atribuir al efecto de los inhibidores de PDE, ya que al analizar la pendiente de las curvas ($0,09 \pm 0,01$ mN/s SAM-R1 y $0,13 \pm 0,05$ mN/s SAM-P8 en presencia de ODQ, y $0,09 \pm 0,03$ mN/s SAM-R1 y $0,66 \pm 0,13$ mN/s SAM-P8 en presencia de L-NOARG) ésta fue significativamente menor que la que presentaban las preparaciones estimuladas en ausencia de inhibidores ($0,8 \pm 0,1$ mN/s en SAM-R1 y $2,7 \pm 0,5$ mN/s en SAM-P8) (**Figs. 166 B, 169 B-C y 171**).

Como resumen de estos resultados se puede concluir que también en el cuerpo cavernoso la relajación de larga duración inducida por EFS es fundamentalmente nitrérgica y que además tanto ésta como la originada por la adición exógena de DEA/NO se produce por la activación de la guanilato ciclasa y el consiguiente aumento de cGMP en el tejido.

4.4.4. Diferencias en la funcionalidad endotelial del cuerpo cavernoso

4.4.4.1. Respuesta relajante/contráctil inducida por ACh

Se ha descrito en numerosas ocasiones que ante una estimulación colinérgica el endotelio que recubre los espacios lacunares del cuerpo cavernoso libera diversos mediadores que pueden modificar el estado de contractilidad del músculo liso adyacente. Los posibles cambios que pudiera estar produciendo el envejecimiento sobre esta vía de señalización, se investigaron analizando las curvas dosis-respuesta de ACh en preparaciones de cuerpo cavernoso de ambas estirpes de ratones.

En las **figuras 172 y 173** se observa como en preparaciones de cuerpo cavernoso contraídas con **NA**, la **ACh** provocó relajación o contracción muscular según la dosis a la que se aplicó. Así, en el ratón normal la adición exógena acumulativa de ACh (10^{-8} a 10^{-2} M) en preparaciones precontraídas con NA (50 μ M) originó una respuesta relajante dosis-dependiente del tejido hasta alcanzar 10^{-5} o 10^{-4} M, tornándose en contracción a concentraciones superiores (hasta 10^{-2} M). En los animales envejecidos la respuesta relajante parece revertir en contracción a una dosis ligeramente inferior (10^{-5} M), observándose un claro efecto contráctil a dosis de 10^{-4} y superiores. Este hecho sugiere una mayor sensibilidad a la respuesta contráctil dependiente del endotelio en los animales envejecidos, observación que se verá reforzada por los resultados expuestos más adelante.

El análisis detallado de la curva dosis-respuesta de relajación a dosis bajas de ACh (de 10^{-8} a 10^{-4} M en SAM-R1 y de 10^{-8} a 10^{-5} M en SAM-P8) mostró relajaciones fásicas dosis-dependientes cuyo valor máximo, alcanzado a la dosis de 10^{-5} M en ambas estirpes de ratones, no fue significativamente diferente entre los ratones normales y envejecidos (**Figs. 172 y 173; Tabla 19**). Los valores de pEC_{50} de ambas curvas también fueron similares (**Tabla 19**), sugiriendo que la respuesta de relajación inducida por ACh no se modifica con el envejecimiento.

Por el contrario, la curva dosis-respuesta de contracción a dosis altas de ACh (de 10^{-4} a 10^{-2} M en SAM-R1 y de 10^{-5} a 10^{-2} M en SAM-P8) mostró contracciones fásicas dosis-dependientes que alcanzaron la respuesta máxima en 10^{-2} M en ambas estirpes, pero con mayor amplitud en los animales envejecidos (**Figs. 172 y 173; Tabla 20**). El valor pEC_{50} de la respuesta contráctil fue significativamente mayor en animales SAM-P8 que en SAM-R1 (**Tabla 20**). Estos resultados sugieren un cambio con el envejecimiento en la sensibilidad del músculo del cuerpo cavernoso a los mediadores contráctiles endoteliales liberados en respuesta a la ACh, o en la cantidad o naturaleza de las sustancias liberadas por el endotelio.

En resumen, los resultados nos muestran una relajación endotelial del cuerpo cavernoso similar entre ambas estirpes de ratones mientras que se potencia la contracción de origen endotelial inducida por ACh con el envejecimiento.

4.4.4.2. Mediadores implicados

Debido a la complejidad de esta doble respuesta relajante-contráctil inducida por la ACh y para facilitar la comprensión de las modificaciones que pudieran producirse en cada uno de sus componentes por el envejecimiento, se analizó cada una por separado (**Tablas 19 y 20**).

a) Respuesta relajante

Para determinar los mediadores implicados en la respuesta relajante inducida por la ACh en ambas estirpes de ratones, se incubó el tejido con antagonistas de diferentes neurotransmisores o mediadores.

En ambas estirpes de ratones, el bloqueo de los receptores muscarínicos con **atropina** (1 μ M, 30 min) produjo un desplazamiento de la curva dosis-respuesta de relajación inducida por **ACh** a la derecha de casi 2 órdenes de magnitud, reduciéndose a la mitad los valores de pEC_{50} y alcanzándose el efecto máximo a una dosis 100 veces mayor (10^{-3} M) aunque no se modificó su amplitud (**Figs. 174 B y 176; Tabla 21**). Estos datos sugieren que la respuesta relajante a dosis bajas de ACh está mediada predominantemente por receptores muscarínicos localizados en el endotelio del cuerpo cavernoso, pero además participaría un segundo mediador relajante que actuaría a dosis altas de ACh, y que es desenmascarado por el bloqueo con atropina de la respuesta muscarínica.

La inhibición de NOS con **L-NOARG** (0,1 mM; 30 min) abolió la respuesta relajante producida por la adición exógena acumulativa de **ACh** (10^{-8} a 10^{-2} M) tanto en preparaciones SAM-R1 como SAM-P8, produciendo una respuesta contráctil del tejido desde el inicio de la curva (**Figs. 174 C y 176; Tabla 21**), y sugiriendo que la relajación del cuerpo cavernoso originada por la ACh es debida a la producción de NO en respuesta a la estimulación colinérgica del endotelio.

Sin embargo, la utilización de **indometacina** como inhibidor de la ciclooxigenasa mostró que también era capaz de reducir la relajación endotelial del cuerpo cavernoso en ambas estirpes de ratones, desplazando significativamente hacia la derecha la curva dosis-respuesta relajante de **ACh** y reduciendo significativamente los valores de potencia (pEC_{50}). Sin embargo, la reducción en los valores de la respuesta máxima no llegaron a alcanzar significación estadística (**Figs. 174 D y 176; Tabla 21**). En estas condiciones la respuesta relajante se transformó en contracción a partir de 10^{-4} M de ACh tanto en SAM-R1 como en SAM-P8. Estos resultados indican que el endotelio, cuando es estimulado por ACh, junto con el NO libera ciertos prostanoïdes derivados de la ciclooxigenasa. El hecho de que esta relajación mediada por prostanoïdes no se manifieste en las preparaciones tratadas con L-NOARG, sugiere que la activación de la ciclooxigenasa sea secundaria a la producción de NO.

En apoyo de esta hipótesis, la inhibición simultánea de ambas enzimas mediante la incubación conjunta con **indometacina** (30 μ M, 30 min) y **L-NOARG** (0,1 mM; 30 min) inhibió casi por completo la respuesta relajante en ambas estirpes (**Figs. 174 E y 176; Tabla 21**). Este efecto no fue significativamente diferente del provocado por la

incubación con L-NOARG sólo, sugiriendo que la producción de NO por parte de eNOS constituye el elemento esencial en el desencadenamiento de la respuesta relajante.

La posibilidad de que la relajación producida por el neurotransmisor colinérgico estuviera relacionada con la liberación de NA se estudió analizando el efecto de la fentolamina sobre la curva dosis-respuesta de ACh en preparaciones precontraídas con AVP (0,1 μ M). Este agonista contráctil originó contracciones sostenidas y estables del cuerpo cavernoso cuya amplitud no fue significativamente diferente entre los ratones control ($72,8 \pm 9,6\%$ de la contracción a KCl 120 mM) y envejecidos ($94,9 \pm 10,4\%$ de la contracción a KCl 120 mM). Además, en preparaciones precontraídas con AVP (0,1 μ M) la adición exógena acumulativa de ACh (10^{-8} a 10^{-2} M) provocó en ambas estirpes una respuesta similar a la registrada en las preparaciones contraídas con NA, y al igual que en este caso, el inicio de la respuesta contráctil se ve adelantada y potenciada por el envejecimiento (**Figs.175 A y 176; Tabla 21**). La posterior incubación de estas preparaciones con **fentolamina** (10 μ M, 30 min) desplazó significativamente hacia la derecha la curva dosis-respuesta relajante de ACh (10^{-8} a 10^{-2} M), pero potenció la relajación máxima que en este caso se obtuvo en ambos grupos a la concentración de 10^{-3} M, aunque no se originó un aumento estadísticamente significativo de los valores de E_{max} . Por lo tanto, la contracción inducida a las dosis altas de ACh se convirtió en relajación en presencia de fentolamina (**Figs.175 B y 176; Tabla 21**). Estos resultados sugieren la participación de la liberación de NA de los nervios intramurales en la respuesta contráctil inducida por ACh en el cuerpo cavernoso. De tal forma que su inhibición lleva a una potenciación de la respuesta relajante a dosis en las que predominaría el efecto contráctil.

Por último, para determinar si la respuesta relajante resistente a fentolamina era de origen nitrérgico se incubaron las preparaciones con L-NOARG (0,1 mM; 30 min) en presencia de **fentolamina** (10 μ M). En estas condiciones la curva dosis-respuesta relajante que se obtuvo al añadir la ACh (10^{-8} a 10^{-2} M) mostró un gran desplazamiento a la derecha con valores de pEC_{50} menores que en los animales no tratados, aunque no se modificó la relajación máxima obtenida a dosis altas de ACh (**Figs.175 C y 176; Tabla 21**). Estos resultados sugieren que mientras la producción de NO participa en la respuesta relajante inducida por dosis bajas de ACh no parece estar implicado en la relajación a dosis altas que se manifiesta en presencia de fentolamina. Por lo tanto la liberación de NA contribuiría a la contracción inducida por ACh y/o enmascararía un componente relajante independiente de NO a dosis altas de ACh.

b) Respuesta contráctil

En ambas estirpes de ratones, la incubación del tejido con **atropina** (1 μ M, 30 min) produjo una abolición total de la respuesta contráctil dosis-dependiente que se manifestaba a dosis altas de ACh (de 10^{-4} a 10^{-2} M) (**Figs. 174 B y 177; Tabla 22**), sugiriendo que la activación de receptores muscarínicos es el principal mecanismo de dicha contracción.

La inhibición de la enzima NOS sin embargo tuvo un efecto distinto en animales controles y envejecidos. En las preparaciones de cuerpo cavernoso SAM-R1, la preincubación con **L-NOARG** (0,1 mM; 30 min) originó una potenciación muy clara de la contracción inducida por ACh originando un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta, con el consecuente aumento en los valores de pEC_{50} , sin que se modificara significativamente el efecto máximo (**Figs. 174 C y 177; Tabla 22**). Estos resultados sugieren que el efecto relajante que ejerce la ACh por intermedio de la producción de NO está contrarrestando su efecto contráctil. Sin embargo, en los ratones envejecidos no se observó el mismo fenómeno. La preincubación con **L-NOARG** (0,1 mM; 30 min) no modificó de forma significativa la curva dosis-respuesta de contracción inducida por ACh, con valores similares de pEC_{50} a los obtenidos en la curva control. Sin embargo, el efecto máximo obtenido a 10^{-2} M fue significativamente menor en presencia de L-NOARG, reduciéndose en un 60% aproximadamente (**Figs. 174 C y 177; Tabla 22**). Estos resultados podrían ser debidos a una menor producción de NO en los animales envejecidos, y por lo tanto a un menor antagonismo de la contracción inducida por ACh. De acuerdo con esta hipótesis, la inhibición de la producción de NO tendría como resultado un menor cambio en la respuesta contráctil. Pero además, el efecto inhibidor de L-NOARG sobre la respuesta máxima contráctil sugiere algún mecanismo adicional que se manifiesta a dosis altas de ACh. Una acción potenciadora de la contracción en la que participe la producción de NO por parte de la NOS podría ser una posibilidad.

La inhibición de la ciclooxigenasa con **indometacina** (30 μ M, 30 min) originó tanto en preparaciones SAM-R1 como SAM-P8 una inhibición significativa de la curva dosis-respuesta de contracción inducida por ACh (10^{-8} a 10^{-2} M). Así, la magnitud de la respuesta máxima se vio significativamente reducida en aproximadamente un 65% en SAM-R1 y un 75% en SAM-P8. Además, los valores de pEC_{50} fueron significativamente menores que en la curva control en ratones SAM-P8 (**Figs. 174 D y 177; Tabla 22**). Esta inhibición de la contracción producida por la indometacina elimina las diferencias en la respuesta contráctil endotelial del cuerpo cavernoso inducida por ACh debidas al envejecimiento (**Tabla 22**) sugiriendo que uno de los principales factores que se vea modificado en los animales envejecidos sea una mayor producción de prostanoideos contráctiles. Esta mayor producción de factores contráctiles se asociaría

a una menor producción de NO, teniendo en cuenta además los resultados obtenidos con L-NOARG, colaborando ambos mecanismos a una sensibilización de la respuesta contráctil del cuerpo cavernoso con el envejecimiento.

El tratamiento conjunto con **indometacina** y **L-NOARG** (30 μ M y 0,1 mM; respectivamente, 30 min), originó de nuevo un efecto diferencial en ratones SAM-R1 y SAM-P8. Así, en los ratones control la doble inhibición potenció la contracción desplazando hacia la izquierda la curva dosis-respuesta contráctil de ACh, con aumentos significativos en la potencia de la contracción, efecto que recuerda al que se producía por la incubación con L-NOARG únicamente, aunque de menor magnitud (**Figs. 174 E y 177; Tabla 22**). Por el contrario, en los ratones envejecidos predominó el efecto inhibitorio de la respuesta contráctil semejante a la que producía la indometacina por sí sola (**Figs. 174 E y 177; Tabla 22**). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que en el cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 se produzcan prostanoideos contráctiles que potencien la contracción inducida por ACh, pero además debe existir una importante producción endotelial de NO que limita la contracción, predominando este segundo efecto inhibitorio nitrérgico. Como se ha sugerido anteriormente, si el envejecimiento produce por un lado un aumento en la producción de prostanoideos contráctiles y por otro una disminución en la síntesis de NO, el efecto neto será un predominio de la acción potenciadora prostanoide.

Por último se analizó la respuesta contráctil originada por la adición acumulativa de **ACh** (10^{-8} a 10^{-2} M) en las preparaciones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con **AVP** (0,1 μ M) en ausencia y presencia de fentolamina y otros inhibidores. La respuesta contráctil control mostró como los animales envejecidos presentaron unos valores de pEC₅₀ y de E_{max} que eran significativamente mayores que los observados en SAM-R1 (**Figs. 175 A y 177; Tabla 22**), revalidando los resultados obtenidos anteriormente en preparaciones contraídas con NA. La incubación con **fentolamina** (10 μ M, 30 min) inhibió significativamente la respuesta contráctil producida por la ACh en las preparaciones de ambas estirpes de ratones, desplazando significativamente a la derecha la curva dosis-respuesta contráctil en ambos casos, y reduciendo la amplitud de la respuesta máxima en aproximadamente un 75% en las dos estirpes, aunque sólo se alcanzó significación estadística en SAM-P8 (**Figs. 175 B y 177; Tabla 22**). Estos resultados sugieren que una gran parte de la contracción producida por la ACh en el cuerpo cavernoso es debida en última instancia a la liberación de NA de los nervios adrenérgicos. La posterior adición de **L-NOARG** (0,1 mM; 30 min) en presencia de **fentolamina** (10 μ M) abolió la respuesta contráctil originada por la adición acumulativa de **ACh** en las preparaciones SAM-P8 sin modificar la respuesta en las preparaciones SAM-R1 (**Figs. 175 C y 177; Tabla 22**). Estos resultados refuerzan la hipótesis presentada anteriormente de que con el envejecimiento se produce la aparición de un

mecanismo potenciador de la contracción inducida por ACh que es dependiente de la síntesis de NO.

4.4.5. Cambios en la densidad de inervación en el cuerpo cavernoso

4.4.5.1. Inervación colinérgica

La inmunodetección de VAcHT en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8 mostró una distribución de nervios colinérgicos similar en ambas estirpes de ratones (**Figs. 178 y 179**). Estos aparecían como finas terminaciones nerviosas formadas por un gran número de pequeñas varicosidades, rodeando las trabéculas de músculo liso de la zona cavernosa, y en algunos casos en los márgenes de los espacios lacunares (**Figs. 178 A-B y 179 B-C**). En la zona de la túnica albugínea la inervación colinérgica se presentó fundamentalmente rodeando los vasos sanguíneos (**Fig. 178 C y D**). No se observó inmunorreactividad en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (resultados no mostrados).

La cuantificación de la densidad de inervación colinérgica en las preparaciones de cuerpo cavernoso mostró como la densidad de nervios colinérgicos no fue diferente entre ratones SAM-R1 y SAM-P8 (**Fig. 188**).

4.4.5.2. Inervación nitrérgica

En la **figura 180** se pueden observar las imágenes representativas de inmunofluorescencia de nNOS en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8. La inervación nitrérgica en ambas estirpes se presentó como terminaciones nerviosas finas o gruesas que aparecían a menudo rodeando a las trabéculas musculares (**Figs. 180 A y 181 A-B**) o también con una disposición más irregular con numerosas ramificaciones (**Fig. 180 B**). Se detectaron también algunos troncos nerviosos, que aparecían habitualmente en la región de la túnica albugínea (**Fig. 180 C**), zona en la que también se observó muy a menudo inervación perivascular positiva a nNOS (**Figs. 181 C y D**). Tampoco con este marcador se detectó inmunorreactividad en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (resultados no mostrados).

La cuantificación de la densidad de inmunorreactividad a nNOS mostró en el cuerpo cavernoso de los animales envejecidos un aumento a más del doble de la observada en los ratones SAM-R1 (**Fig. 180**).

4.4.5.3. Inervación adrenérgica

Los resultados del estudio de inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* del cuerpo cavernoso de ambas estirpes de ratones mostraron una distribución de la inervación adrenérgica semejante a la obtenida con la inmunodetección de nNOS (**Fig. 182**), de manera que los nervios adrenérgicos se manifestaban generalmente en forma de delgadas o gruesas terminaciones nerviosas que de forma habitual se disponían alrededor de las trabéculas de músculo liso, disposición que se puede apreciar en detalle en la **figura 183 A y B**, aunque también se las podía encontrar con trayectos sinuosos e irregulares, sobretodo en los animales envejecidos donde la densidad de inervación era más abundante (**Fig. 182 A y B**). Se observaron en ocasiones algunos troncos nerviosos inmunorreactivos a TSH aislados o colocados entre la red de nervios finos (**Fig. 182 B**). También con este marcador se detectó inervación perivascular en la túnica albugínea (**Fig. 183 C y D**) de ambas estirpes, zona donde los nervios además solían discurrir paralelamente unos a otros y a las fibras del tejido muscular (**Fig. 182 C y D**). Una vez más no se observó inmunorreactividad en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (resultados no mostrados).

En la **figura 188** aparece la cuantificación de la densidad de inmunorreactividad a TSH del cuerpo cavernoso donde se observa un aumento significativo en SAM-P8 a valores más del doble de los observados en ratones SAM-R1.

4.4.6. Cambios en la inmunorreactividad a eNOS en el cuerpo cavernoso

En el cuerpo cavernoso, el endotelio que recubre los espacios lacunares constituye una fuente adicional de NO a partir de la eNOS, cuya expresión constitutiva también podría verse alterada por el envejecimiento. La inmunodetección de eNOS se llevó a cabo en cortes longitudinales de 10 μ m de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8.

Las imágenes representativas de inmunofluorescencia a eNOS se muestran en la **figura 184**, donde se aprecia como la enzima se localiza principalmente en el endotelio que recubre los espacios lacunares tanto en SAM-R1 como en SAM-P8. En la **figura 185** se puede observar este intenso marcaje del endotelio a mayores aumentos, donde se distinguen algunas células endoteliales individuales conteniendo la enzima.

Al cuantificar la inmunorreactividad de la eNOS no se obtuvieron diferencias significativas entre los ratones controles y envejecidos (**Fig. 188**).

4.4.7. Cambios en la densidad de ICCs del cuerpo cavernoso

4.4.7.1. Densidad de ICCs positivas a vimentina

La inmunorreactividad a vimentina en el cuerpo cavernoso se cuantificó también en cortes longitudinales del tejido. La **figura 186** muestra la presencia de una gran densidad de ICCs de morfología fusiforme distribuidas de forma uniforme por todo el tejido en ambas estirpes de ratones. A mayores aumentos en la **figura 187 A** se puede observar como las células intersticiales aparecen principalmente dentro de las trabéculas de músculo liso, y como la vimentina también puede marcar el endotelio que recubre los espacios cavernosos. En la **figura 187 B** se muestra una célula intersticial a grandes aumentos en la que se aprecia la típica morfología bipolar fusiforme, con largas prolongaciones y un gran núcleo ovoide, característica de la mayoría de las ICCs presentes en este tejido.

La cuantificación de la inmunorreactividad a vimentina tampoco reveló diferencias significativas en la densidad de ICCs de ambas estirpes de ratones (**Fig. 188**).

4.4.7.2. Inmunorreactividad a cGMP

El marcaje simple de cGMP en el cuerpo cavernoso se realizó con el fin de determinar la localización y el grado de acumulación de este nucleótido en el tejido cuando es sometido a diferentes estimulaciones y tratamientos, así como para investigar las posibles modificaciones inducidas por el envejecimiento en dicha acumulación.

En este estudio una vez más se utilizaron cortes longitudinales del tejido por obtenerse un mejor marcaje de cGMP en estas condiciones que en preparaciones *whole-mount*.

4.4.7.2.1. Inmunorreactividad a cGMP inducida por DEA/NO o por EFS

La **figura 189** muestra la inmunorreactividad a cGMP en cortes longitudinales de preparaciones de cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8 que han sido estimuladas con DEA/NO (0,1 mM) o EFS (4 Hz, 4 min) en presencia de IBMX y zaprinast (ambos a 0,1 mM). También se muestra el marcaje basal de cGMP provocado por la presencia exclusiva de los dos inhibidores de las PDEs. Se puede observar claramente como en las preparaciones tratadas exclusivamente con IBMX y zaprinast durante los 4 minutos (**Fig. 189 A y B**) el marcaje a cGMP es claramente menor al de las preparaciones estimuladas (**Fig. 189 C-F y 194**), demostrándose así la especificidad de la acumulación de cGMP en

el tejido por el DEA/NO o por EFS. La densidad de inmunorreactividad a cGMP en ambas situaciones no fue diferente en animales SAM-R1 y SAM-P8 (**Fig. 194**).

En las preparaciones estimuladas mediante la adición de DEA/NO exógeno (**Fig. 189 C-D**) se observó como el marcaje de cGMP se concentra especialmente en los bordes de las trabéculas de músculo liso. En la **figura 191** se aprecia a mayores aumentos como el marcaje de esta zona es debido tanto a la aparición de ICCs fusiformes que contienen el nucleótido (**Fig. 191 C, E y F**), como a la presencia de algunas células musculares lisas inmunorreactivas al cGMP (**Fig. 191 D y E**). No obstante en estas condiciones la intensidad del marcaje fue superior en las células intersticiales que en las musculares. También aparecieron ICCs inmunorreactivas a cGMP en la zona de la túnica albugínea (**Fig. 191 B**), e incluso posibles pericitos conteniendo el nucleótido en la pared de algunos vasos del tejido (**Fig. 191 A**). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación de inmunorreactividad a cGMP provocada por el DEA/NO en ambas estirpes de ratones (**Fig. 194**), en concordancia con los estudios funcionales.

En cuanto a las preparaciones estimuladas eléctricamente (EFS 4 Hz, 4 min) se observó que, aunque en menor medida que en el caso anterior, el cGMP también se localizaba preferentemente entre las trabéculas musculares (**Fig. 189 E y F**) en ambas estirpes de ratones, apareciendo la inmunorreactividad al nucleótido principalmente en ICCs fusiformes que se encontraban rodeando las trabéculas de músculo liso (**Fig. 190 B-E**). Las células musculares lisas también aparecieron marcadas por cGMP de forma intensa en numerosas ocasiones (**Fig. 190 A**) y también se observaron estructuras perivasculares inmunopositivas a cGMP (**Fig. 190 F**). En este caso tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la densidad de marcaje a cGMP entre ratones SAM-R1 y SAM-P8 (**Fig. 194**), corroborándose de nuevo los resultados obtenidos en los estudios funcionales.

4.4.7.2.2. Efecto de la inhibición de la GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)

En preparaciones de cuerpo cavernoso estimuladas con DEA/NO (0,1 mM) en presencia del inhibidor de la guanilato ciclasa ODQ (0,1 mM), el marcaje a cGMP se vio reducido significativamente en ambas estirpes de ratones (**Fig. 192 y 194**), con desaparición completa de la inmunorreactividad en los ratones controles, mientras que en los envejecidos persistió un marcaje residual (**Fig. 194**).

La **figura 193** muestra la desaparición total de inmunorreactividad a cGMP en las preparaciones de cuerpo cavernoso que han sido estimuladas mediante EFS (4 Hz, 4 min) en presencia de L-NOARG o de ODQ (ambos a 0,1 mM). La cuantificación de

estos resultados se muestra en la **figura 194**, donde además se observa un efecto similar en ambas estirpes de ratones.

4.4.8. Estudios de colocalización en el cuerpo cavernoso

4.4.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores

a) Acetilcolina (VChT)- NO (nNOS)

El doble marcaje de VChT y nNOS en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8 mostró nervios colinérgicos y nitrérgicos discurriendo muy próximos de forma paralela, llegando a contactar ambas fibras nerviosas en numerosos puntos (**Fig. 195 A-C, D-F y G**). En ocasiones una misma terminación nerviosa parecía ser inmunorreactiva a ambos marcadores (**Fig. 195 G y H**), así como también se encontró esta aparente colocalización en posibles células ganglionares encontradas esporádicamente en la zona de la túnica albugínea (**Fig. 195 A-C**). El grado de coexistencia de la nNOS y la ACh en la misma fibra nerviosa parece ser menor que en la vejiga y la uretra.

b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)

En la **figura 196** se observa la relación estructural entre las fibras nitrérgicas y adrenérgicas del cuerpo cavernoso de los ratones SAM-R1 y SAM-P8 obtenida mediante la inmunofluorescencia doble de TSH-nNOS en preparaciones *whole-mount* de este tejido. En este caso el patrón de colocalización fue similar al registrado en la vejiga y la uretra. Se observa como en algunos puntos existe un alto nivel de colocalización de ambos marcadores, sobretudo en troncos nerviosos localizados tanto en la zona de la túnica albugínea como en la zona cavernosa (**Fig. 196 C y H**), mientras que en otros los marcadores aparecen en fibras separadas que discurren paralelamente dentro de un mismo tronco o de forma aislada. En la **figura 196 I** se aprecia claramente como ambos tipos de nervios aparecen rodeando una misma trabécula muscular.

4.4.8.2. Relación entre ICCs positivas a vimentina y nervios intramurales

a) Vimentina-Acetilcolina (VChT)

Mediante la inmunofluorescencia doble de VChT-vimentina en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8 se estableció cuál era la relación estructural de las ICCs y los nervios colinérgicos en el tejido eréctil del ratón.

En estas preparaciones se observó la presencia de fibras colinérgicas muy próximas a la densa red de ICCs de morfología fusiforme de la zona cavernosa. En la **figura 197 A-C** se puede observar como las varicosidades que dan forma al nervio colinérgico contactan en numerosas ocasiones con ICCs. A mayores aumentos se aprecia en detalle como las terminaciones nerviosas aparecen discurriendo en la misma dirección que las ICCs de forma tan próxima que llegan a contactar en numerosos puntos (**Fig. 197 D y E**).

b) Vimentina- Noradrenalina (TSH)

En la **figura 198** se muestran fotografías de preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso SAM-P8 en las que se realizó un doble marcaje de TSH-vimentina. Se aprecia como en este tejido las ICCs también contactan frecuentemente con los nervios adrenérgicos. En la **figura 198 D, E y F** se pueden observar los puntos de contacto a mayores aumentos, y como en algunos casos la relación es tan estrecha que parece que estén unidas las superficies de ambas estructuras (**Fig. 198 F**).

4.4.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP

Para determinar si las células inmunorreactivas a cGMP del cuerpo cavernoso que presentaban morfología fusiforme eran en efecto ICCs se realizó el doble marcaje de cGMP y vimentina en cortes longitudinales de preparaciones SAM-R1 y SAM-P8 que habían sido sometidas a tratamiento previo con EFS o DEA/NO.

En la **figura 199** se muestran las fotografías pertenecientes a las preparaciones estimuladas eléctricamente, donde se puede apreciar la colocalización clara de ambos marcadores en algunas ICCs pero no en todas, apareciendo también muchas células positivas a vimentina que no lo son para cGMP (**Fig. 199 A-C**). En la **figura 199 D-F** se observan a mayores aumentos algunas de estas células donde colocalizan ambos marcadores, apreciándose como el marcaje a cGMP se localiza en el citoplasma celular mientras que el marcaje a vimentina es más periférico. En algunos casos sin embargo también se detectó colocalización de los dos marcadores en el interior celular (**Fig. 199 I**). Normalmente esta colocalización se encontró en células que aparecían bordeando las trabéculas de músculo liso. En la **figura 199 H** se aprecia esta disposición de forma muy clara. También en algunas estructuras perivasculares se detectó inmunorreactividad a ambos marcadores (**Fig. 199 G**).

En las preparaciones estimuladas mediante la adición de DEA/NO se observó un patrón de colocalización muy similar, de manera que existían a lo largo de todo el tejido numerosas células inmunopositivas únicamente a vimentina, pero un gran número de las que se localizaban bordeando a las trabéculas musculares eran inmunorreactivas también

para el cGMP. Cabe mencionar en este caso que no todas las células de esta zona que eran reactivas a cGMP se marcaban también con vimentina (**Fig. 200 A-C, D-F y H**). En la **figura 200 G** se muestra a mayores aumentos como también en este caso el marcaje de vimentina es más periférico mientras que el marcaje de cGMP se localiza principalmente en el citoplasma.

En resumen, estos resultados indican que tanto la estimulación eléctrica de los nervios nitrérgicos del cuerpo cavernoso como la adición exógena de un donante de NO provoca la acumulación de cGMP especialmente en células fusiformes, la mayoría también reactivas a vimentina y que por lo tanto pueden ser consideradas ICCs. Por lo tanto las ICCs del cuerpo cavernoso actuarían como células efectoras del NO producido tanto por el endotelio (eNOS) como por los nervios nitrérgicos intramurales (nNOS).

V. DISCUSIÓN

La estirpe de ratón SAM-P8 constituye un modelo experimental útil para el estudio de los procesos patológicos humanos asociados al envejecimiento, pues desarrolla senescencia de forma espontánea y prematura, manifestándose tanto en la apariencia externa y el comportamiento como en la aparición de una serie de desórdenes degenerativos asociados a la edad, permitiendo así estudiar el proceso de envejecimiento en un corto periodo de tiempo (Zhu *et al.*, 2001; Forman *et al.*, 2011). Además, el poder disponer de un control interno que presenta una senescencia propia del envejecimiento fisiológico (SAM-R1) (Takeda *et al.*, 1981; Forman *et al.*, 2011) hace de este modelo una herramienta única para este tipo de estudios. A esto habría que añadir, la ventaja del uso de ratones en los estudios de patologías humanas por la cantidad de información genética que se conoce de la especie, la cual, además, es muy similar a nuestra especie (Sprott, 1994).

Esta estirpe ha permitido desarrollar en nuestro caso un estudio amplio y conjunto de las modificaciones que se dan en la funcionalidad y estructura del tracto urinario inferior y del cuerpo cavernoso durante la senectud, las cuales se describen a continuación.

El aspecto de la estirpe SAM-P8 entre los 9 y los 10 meses de edad confirmó la rápida aparición en estos ratones de características fenotípicas propias de animales de edad avanzada descritas previamente, tales como piloerección, ulceraciones oculares, protusión del apéndice xifoides, pérdida de peso y actividad, y aparente desorientación (Takeda *et al.*, 1997). Sin embargo, no se detectaron tumores u otras patologías aparentes en los órganos del tracto urinario inferior de estos animales respaldando la elección de este modelo experimental para nuestro estudio. La ausencia de diferencias en el peso relativo de los órganos genitourinarios coincide con los datos obtenidos en vejiga humana (Gosling, 1997; Michel y Barendrecht, 2008) y permite descartar a su vez un papel de tales alteraciones en la disfunción urinaria o eréctil asociada a la vejez.

Por otro lado el mayor peso vesical en los machos de ambas estirpes indica diferencias de género ya observadas previamente en esta especie (Mucignat-Caretta *et al.*, 2004) que contrastan sin embargo con estudios en diferentes estirpes de rata donde el peso vesical de las hembras era relativamente mayor que el de los machos (Longhurst y Levendusky, 2000) o similar al de éstos (Frazier *et al.*, 2006).

El estudio del patrón miccional ha mostrado en los ratones SAM-P8 alteraciones en la frecuencia de micción, con un aumento en el número de micciones totales y en el número de micciones de bajo volumen, indicativo de la aparición de urgencia miccional característica de la hiperactividad vesical propia del envejecimiento. Estos datos funcionales confirman la validez del modelo experimental. Por otro lado, la mayor frecuencia miccional observada en los machos de ambos grupos respecto a las hembras

podría estar relacionada con el mayor tamaño vesical o quizá con comportamientos de marcaje territorial en este género.

5.1. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN LA CAPA MUSCULAR DE LA VEJIGA

En contraste con lo observado por algunos investigadores en vejiga humana (Susset *et al.*, 1978; Lepor *et al.*, 1992; Holm *et al.*, 1995), el análisis histológico de la vejiga de los ratones SAM-P8 no ha mostrado alteraciones tisulares aparentes con el envejecimiento, presentando éstos un grosor de lámina propia y capa muscular similar al de los animales control en ambos sexos, sugiriendo que con la edad no se dan diferencias en la cantidad de tejido conectivo presente en estas capas, así como tampoco ninguna alteración en el grosor o disposición de los haces musculares. Estos resultados no obstante son coincidentes con los estudios que postulan que el envejecimiento *per se* no induce cambios ultraestructurales en la vejiga (Hodges, 1978; Phillips y Davies, 1980; Gosling, 1997; Elbadawi *et al.*, 1998), indicando que probablemente no sea una alteración tisular de este órgano la responsable de la disfunción urinaria durante el envejecimiento.

Ocasionalmente sí se ha detectado infiltración celular en la submucosa vesical de los ratones SAM-P8, similar a la descrita tanto en ratones C57BL/6J envejecidos, donde aumenta la presencia de linfocitos, leucocitos y células plasmáticas (Phillips y Davies, 1980), como en el urotelio de personas de edad avanzada (Jacob *et al.*, 1978). Este hecho podría estar relacionado con alguna alteración autoinmune propia del envejecimiento (Phillips y Davies, 1980).

Una alta concentración de KCl (120 mM) provoca una estimulación muscular directa debida a la despolarización del músculo y la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, siendo por lo tanto un método adecuado para analizar los cambios inespecíficos de la contractilidad muscular. La contracción inducida por KCl en la vejiga fue similar en ambas estirpes de ratones indicando por tanto que el envejecimiento no afecta a los mecanismos contráctiles básicos tales como la activación por Ca^{2+} intracelular de la contracción, las interacciones actina-miosina o Ca^{2+} -calmodulina, ratificando así los resultados obtenidos por diversos investigadores en humanos y otras especies animales (Chun *et al.*, 1989; Ordway *et al.*, 1986; Saito *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 2001; Lluet *et al.*, 2000).

La vejiga de los machos de ambas estirpes presentó una mayor capacidad contráctil que la de las hembras, hecho que pudiera estar relacionado con el mayor tamaño vesical y/o con la mayor frecuencia miccional observada en este género. Alternativamente, esta

mayor contractilidad podría reflejar un mecanismo vesical adaptativo para superar la mayor resistencia uretral debida a la mayor longitud de la uretra masculina, hecho que ya ha sido descrito en cobayas (Pessina *et al.*, 2007) y humanos (Schneider *et al.*, 2011).

La estimulación selectiva de las terminaciones nerviosas intramurales de las preparaciones vesicales *in vitro* por EFS provoca una respuesta contráctil debida a la liberación de los neurotransmisores contenidos en las mismas y su acción postsináptica específica. El empleo de antagonistas específicos de estos efectos postsinápticos nos ha permitido analizar los mediadores implicados y los cambios que se producen con el envejecimiento. Debido a la existencia de importantes diferencias entre las respuestas neurogénicas entre machos y hembras, hemos analizado cada género por separado.

La magnitud de la contracciones vesicales inducidas por EFS fue similar en ambos géneros de ratones SAM-R1 en concordancia con lo previamente descrito en otras especies animales y en humanos (Dambros *et al.*, 2004; Longhurst y Levendusky, 2000; Fry *et al.*, 2010).

Nuestros resultados indican que las respuestas neurogénicas en ratones SAM-R1 de ambos sexos son predominantemente colinérgicas con una menor participación de la liberación de ATP de nervios purinérgicos. Estos datos concuerdan con los múltiples estudios que establecen que la vía colinérgica muscarínica es la principal responsable de la contracción vesical tanto en el ratón como en la mayoría de los mamíferos (Matsui *et al.*, 2002; Andersson y Wein, 2004; Fry *et al.*, 2010), junto con la participación de un pequeño componente purinérgico, atropina-resistente (Yoshida *et al.*, 2001; Hoyle *et al.*, 1989; Ruggieri *et al.*, 1990; Palea *et al.*, 1993; O'Reilly *et al.*, 2002). La extensa red de nervios colinérgicos de la capa muscular de la vejiga SAM-R1, refuerza el papel principal de la neurotransmisión colinérgica en la contracción vesical, similar al resto de especies estudiadas (Giglio y Tobin, 2009).

No obstante, sí se observaron diferencias en la participación relativa de los diferentes mediadores en la respuesta contráctil. Así, en el ratón macho la participación colinérgica es mayor que en hembras (72% y 60% respectivamente) y el componente purinérgico, sensible al $\alpha\beta$ -Metilen-ATP, sería responsable de toda la respuesta residual no colinérgica. En conjunto, la participación purinérgica en el ratón macho es menor que en la hembra. Así, el ATP no parece capaz de sustituir a la ACh cuando se producen alteraciones en la contracción colinérgica a tenor de la severa retención de orina observada en machos de ratones knock-out del receptor M₃, principal mediador en esta respuesta (Andersson y Wein, 2004), a diferencia de la hembra (Matsui *et al.*, 2000). Sin embargo recientemente en cobaya y rata se ha observado que es el macho el que presenta un mayor componente purinérgico en la contracción vesical (Creed *et al.*, 2010), sugiriendo importantes diferencias inter-específicas.

En el presente estudio, tanto la densidad de innervación colinérgica como su distribución fue similar en ambos géneros de ratones SAM-R1, y de forma similar no hemos encontrado diferencias significativas en las contracciones inducidas por agonistas exógenos (ACh y ATP) en concordancia con estudios previos en humanos y otras especies animales (Choppin, 2002; Kories *et al.*, 2003; An *et al.*, 2002; Fry *et al.*, 2010). Por lo tanto podríamos descartar que las diferencias de género observadas en la respuesta colinérgica sean debidas a una diferente densidad de nervios o de receptores postsinápticos musculares, similar a lo descrito en la vejiga de ratas de ambos sexos (Kories *et al.*, 2003). Al no existir un marcador específico de nervios purinérgicos no hemos podido realizar un estudio comparativo similar, no obstante el hecho de que las respuestas a la adición exógena de ATP sean similares en ambos sexos sugiere que la diferencia no radica en una desigual densidad de nervios o receptores. Todo ello sugiere la posibilidad de diferencias en los procesos de neuromodulación presináptica. Por ejemplo se ha descrito la participación de diferentes subtipos de receptores presinápticos con una mayor expresión de los receptores M₂ en el hombre (Arrighi *et al.*, 2008) lo que podría estar facilitando la contracción oponiéndose a la relajación muscular simpática (Hedge *et al.*, 1997).

A diferencia de la innervación colinérgica sí hemos observado que los ratones macho presentaban una densidad de innervación adrenérgica en la capa muscular significativamente mayor que las hembras, en concordancia con estudios previos (Gosling *et al.*, 1999). Una mayor liberación de NA podría teóricamente originar una facilitación presináptica de la liberación de ACh (Somogyi *et al.*, 1995; Szell *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001), explicando así el mayor componente colinérgico en la contracción vesical de los machos. Sin embargo, el hecho de que dichas variaciones de densidad adrenérgica se limiten al trigono, junto con la ausencia de diferencias sexuales en la expresión de los receptores α -adrenérgicos del detrusor (Walden *et al.*, 1997; Latifpour *et al.*, 1990; Sigala *et al.*, 2004), descartaría a la vía adrenérgica como la responsable de esta mayor liberación de ACh en el cuerpo vesical de los machos. Sería a nivel del trigono donde la mayor innervación adrenérgica en el macho tendría una consecuencia funcional directa. Así, en el conejo se ha descrito que las contracciones neurogénicas del trigono vesical son de mayor amplitud en los machos (Lee *et al.*, 1994), ocasionando un cierre más potente del cuello vesical durante la fase de continencia. En este sentido, la mayor densidad de innervación nitrérgica del trigono en el ratón macho descrita en el presente estudio podría contrarrestar esta mayor contracción y permitir la rápida apertura del cuello vesical durante la fase de micción.

Por último, hemos observado una mayor densidad de ICCs en la capa muscular de las hembras. Este hecho podría tener varias consecuencias funcionales. Así, se podría sugerir una mayor dependencia de las ICCs en la coordinación neurogénica de la

actividad de los miocitos de las hembras. Este hecho también podría estar ocasionando una mayor actividad espontánea en la vejiga femenina, dada la posible relación entre actividad miogénica e ICCs (de Jongh *et al.*, 2007a; Collins *et al.*, 2009). No obstante, son necesarios estudios más específicos para esclarecer estos aspectos.

5.1.1. Efectos sobre las respuestas neurogénicas en la hembra

Las contracciones inducidas por EFS mostraron un aumento significativo de la contracción neurogénica vesical en hembras SAM-P8, así como un incremento en su sensibilidad dado que la respuesta media se alcanzaba a frecuencias más bajas. Aunque cambios similares no se han observado en muchos estudios realizados en vejigas humanas durante el envejecimiento (Yoshida *et al.*, 2001; Wuest *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2011), sí se han detectado en pacientes con hiperactividad del detrusor, la disfunción urinaria más común durante la senectud (Eaton y Bates, 1982; Kinder y Mundy, 1987; Kosan *et al.*, 2008). Dicha discrepancia podría deberse al hecho de haber incluido en los estudios generalistas sobre la vejez a pacientes que sufren grados variables de disfunción urinaria, o a que no se ha llevado a cabo ninguna valoración de las mismas (Yoshida *et al.*, 2001; Wuest *et al.*, 2005).

En otras estirpes de ratones sí se ha descrito un aumento de la contracción neurogénica vesical durante el primer año de vida (Lai *et al.*, 2007). Hecho que podría no estar limitado a la vejiga ya que un aumento similar durante el envejecimiento ha sido descrito en el íleon y el colon (Abalo *et al.*, 2007; Maselli *et al.*, 2011). Sin embargo, en vejiga de rata o bien no se observan cambios en esta respuesta con la edad (Yu *et al.*, 1996) o bien los incrementos descritos parecen estar relacionados con el aumento en la masa muscular de la vejiga envejecida (Longhurst *et al.*, 1992), sugiriendo diferencias interespecíficas en el envejecimiento vesical.

El hecho de que tanto el bloqueo de los receptores muscarínicos con atropina como la sensibilización de receptores purinérgicos con $\alpha\beta$ -Metilen-ATP produzcan una mayor inhibición de la contracción en ratones envejecidos, sugiere una mayor liberación de ACh y ATP con el envejecimiento, o un aumento de sensibilidad, como responsables de parte del aumento de contracción neurogénica en SAM-P8.

El análisis de la participación relativa de cada uno de estos componentes mostró que ambos participaban en una proporción similar en ambas estirpes de ratones. El hecho de que en SAM-P8 se observara una mayor respuesta residual no sensible a ambos antagonistas, sugiere la mayor implicación de algún otro mediador en la mayor contractilidad en la vejiga envejecida. En este sentido, el hecho de que la inhibición de COX con indometacina en presencia de atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP reduzca significativamente la respuesta residual en SAM-P8 equiparándola a la de SAM-R1,

sugiere la participación de alguna prostaglandina. Los resultados obtenidos al comparar la velocidad de contracción en ambas estirpes de ratonas corroboran esta sugerencia. Así, el aumento en la velocidad de contracción a frecuencias medias observado en SAM-P8 no fue modificado por atropina o $\alpha\beta$ -Metilen-ATP, sugiriendo que este efecto no es debido a una alteración en la liberación o sensibilidad a ACh o ATP con el envejecimiento. Sin embargo, la presencia de indometacina sí eliminó dichas diferencias, apoyando la sugerencia de que las PGs pudieran ser parcialmente responsables de la mayor contractilidad neurogénica en la vejiga femenina durante el envejecimiento.

El hecho de que la contracción vesical inducida por la adición exógena de ACh fuera similar en ambas estirpes indica que la capacidad de respuesta del detrusor de las hembras a este mediador no está alterada por el envejecimiento. Estos resultados coinciden con diversos estudios realizados en vejiga envejecida o hiperactiva tanto en humanos como en otras especies animales (Yoshida *et al.*, 2001; Wuest *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2011; Eaton y Bates, 1982; Kinder y Mundy, 1987; Kosan *et al.*, 2008; Ordway *et al.*, 1986; Lluel *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2005) y sugieren que la mayor respuesta colinérgica en SAM-P8 podría derivar alternativamente de una mayor liberación del neurotransmisor durante el impulso nervioso. Esta posible liberación aumentada de ACh no parece provenir de un aumento en la densidad de innervación ya que la distribución y densidad de innervación colinérgica fue similar en ambas estirpes. Otra posibilidad es que el incremento en la liberación de ACh pudiera estar originado por cambios presinápticos.

En consonancia, en varios estudios realizados en detrusor humano se propone una alteración de los mecanismos neuromoduladores de la contracción (Eaton y Bates, 1982; Kinder y Mundy, 1987; Kosan *et al.*, 2008). El más importante de estos mecanismos es el que está mediado por NA que actuando sobre receptores α -adrenérgicos presinápticos de los nervios colinérgicos origina un aumento en la liberación de ACh (Somogyi *et al.*, 1995; Szell *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001). Sin embargo, y en concordancia con estudios previos (Andersson y Wein, 2004), en la vejiga de ratones hembras, la densa red de nervios y ganglios TSH-inmunorreactivos del trigono disminuye progresivamente hacia la cúpula vesical, siendo su densidad similar en ambas estirpes, sugiriendo por lo tanto que la liberación de NA no se encuentra alterada por el envejecimiento. Sin embargo, aunque la densidad de nervios no se modifique no se puede descartar que sea un aumento en la densidad de receptores adrenérgicos presinápticos la responsable del aumento de la liberación de ACh. Aunque la mayoría de los estudios previos no han observado alteraciones en la densidad de receptores adrenérgicos vesicales con la edad (Kolta *et al.*, 1984; Latifpour *et al.*, 1990; Lluel *et al.*, 2000, 2003a,b), recientemente Dmitrieva *et al.* (2008) describen un aumento en la expresión del receptor α_{1D} en ratas viejas, si bien dicho subtipo parece limitarse al músculo liso y el urotelio, siendo el subtipo α_{1A} el que media la liberación de la ACh en esta especie (Szell *et al.*, 2000). Otro

posible mecanismo de regulación presináptica de la liberación de ACh involucraría a los receptores presinápticos M₁, los cuales facilitan la liberación de ACh de los nervios colinérgicos en la vejiga (Somogyi y de Groat, 1992; Tobin y Sjögren, 1995; Braverman *et al.*, 1998b). De hecho se ha propuesto en las terminaciones nerviosas colinérgicas de la vejiga de ratas con lesión en la médula espinal, donde las contracciones neurogénicas también se potencian (Somogyi *et al.*, 1998), que los mecanismos presinápticos muscarínicos facilitatorios estén potenciados, pudiendo ser ésta la causa de ciertos tipos de hiperactividad del detrusor.

La producción de ACh de fuentes no neuronales podría ser una posibilidad alternativa que explique el efecto potenciador de la contractilidad neurogénica colinérgica con el envejecimiento. Existen estudios que demuestran que la presencia del urotelio en las preparaciones vesicales y uretrales puede modificar la magnitud de la contracción inducida por EFS (Pinna *et al.*, 1996; Fry *et al.*, 2010). Además se ha demostrado un aumento en la liberación de ACh no neural en la vejiga humana en edades avanzadas (Yoshida *et al.*, 2004) inducida tanto por distensión vesical como por contracciones del detrusor, y que podría estar localizada en el urotelio. En nuestro estudio hemos detectado una intensa inmunorreactividad urotelial a VACHT, aunque el fuerte marcaje de fondo común a las preparaciones *whole-mount* utilizadas no ha permitido realizar un estudio comparativo en ambas estirpes.

Por último, habría que considerar la posible implicación de ICCs como neuromoduladores de la contracción vesical (Hashitani *et al.*, 2004; McHale *et al.*, 2006) a través de la coordinación de los miocitos en respuesta a la estimulación colinérgica (Andersson, 2010). Así, se ha demostrado como las ICCs próximas a nervios colinérgicos intramurales muestran incrementos de Ca²⁺ intracelular por la adición de ACh, efecto mediado a través de receptores M₃ (McCloskey, 2010). En nuestros estudios de doble marcaje VACHT-vimentina la densa red de fibras colinérgicas se sitúa de forma paralela no sólo a los fascículos musculares sino también a las ICCs, observándose incluso contactos directos con las varicosidades nerviosas colinérgicas lo que sugeriría que podrían estar modulando dicha neurotransmisión. No obstante, la densidad de ICCs no se vio modificada significativamente por el envejecimiento, por lo que nuestros resultados no permiten inferir a estas células el cambio observado en la contractilidad vesical. No obstante, cambios en la funcionalidad, que no en el número de ICCs, podrían ser responsables de modificaciones en la contractilidad vesical. De hecho, se ha sugerido su implicación en procesos de hiperactividad vesical debido al efecto inhibitor que ejerce imatinib (Glivec®), un inhibidor del receptor c-kit, el cual se expresa de forma específica en algunas ICCs (Biers *et al.*, 2006).

En cuanto al componente purinérgico, es importante destacar que en este caso sí se observó un aumento significativo en la sensibilidad al ATP del detrusor envejecido que

por lo tanto podría ser responsable del aumento observado en la respuesta purinérgica de los ratones SAM-P8, efecto que ya ha sido descrito previamente en humanos, ratas y otras estirpes de ratones (Saito *et al.*, 1991; Kageyama *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2007; Wuest *et al.*, 2005). Este hecho podría estar asimismo asociado al incremento del componente atropina-resistente de la neurotransmisión excitatoria vesical descrito en varias patologías del tracto urinario inferior, como son la inestabilidad del detrusor, la obstrucción vesical y la cistitis intersticial (Sjögren *et al.*, 1982; Palea *et al.*, 1993; Bayliss *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 2002; Tempest., 2004; Fry *et al.*, 2010), y recientemente en envejecimiento (Yoshida *et al.*, 2001). El hecho de que el número de receptores purinérgicos P2X₁ en la vejiga humana obstruida no se encuentre alterado (Chua *et al.*, 2007) y que disminuya (Chua *et al.*, 2007) o no se modifique (Wuest *et al.*, 2005) con el envejecimiento ha llevado a sugerir que este efecto podría ser generado por una alteración en la actividad de las ecto-ATPasas lo que permitiría la disponibilidad de mayores niveles de ATP (Harvey *et al.*, 2002). Por otra parte la observación de incrementos en la expresión de P2X₂ en mujeres con hiperactividad del detrusor (O'Reilly *et al.*, 2002), y de P2Y₄ con el envejecimiento y la diabetes (Suadicani *et al.*, 2009), sugiere la implicación de otros receptores purinérgicos en dichos trastornos.

Nuestro estudio también ha mostrado que el envejecimiento induce la aparición de un nuevo componente de tipo prostanoide en la contracción neurogénica vesical de las hembras. El papel de las PGs en las disfunciones del tracto urinario inferior se ve apoyado por el hecho de que inhibidores de la COX son agentes efectivos en modelos de hiperactividad vesical (Roosen *et al.*, 2009a) así como que bloqueantes del receptor EP₁ aumentan significativamente la capacidad vesical en estudios desarrollados en rata (Lee *et al.*, 2007). Se ha descrito que en mujeres con hiperactividad vesical los niveles urinarios de PGE₂ y de PGF_{2α} aumentan significativamente (Kim *et al.*, 2006; McCafferty *et al.*, 2008), así como que el envejecimiento aumenta los niveles de 8-epi PGF_{2α}, prostanoide derivado del estrés oxidativo. Estos compuestos son capaces de contraer el detrusor humano y de varias especies animales (Andersson, 1993; Tarcan *et al.*, 2000). La liberación de 8-epi PGF_{2α} aumenta en las contracciones inducidas por estimulación nerviosa (Delanty *et al.*, 1996; Tarcan *et al.*, 2000) y la liberación de PGE₂ y PGF_{2α} puede ser activada por distensión vesical, EFS, ACh o ATP (Gilmore y Vane, 1971; Maggi, 1992; Andersson, 1993; Khan *et al.*, 1998; Mumtaz *et al.*, 1999c), lo que hace posible ambos procesos en nuestras preparaciones. Se ha sugerido también que las PGs pueden inhibir a la acetilcolinesterasa (Borda *et al.*, 1982), por lo que aumentaría los niveles de ACh en el tejido envejecido. Aunque se ha postulado que estos mediadores actúan como neuromoduladores de la neurotransmisión eferente y aferente (Andersson y Sjögren, 1982), en nuestro caso el prostanoide, cuya naturaleza desconocemos, parece presentar un efecto directo sobre el detrusor, dada su resistencia tanto a atropina como a αβ-Metilen-ATP. Su efecto fue especialmente relevante a EFS

de baja frecuencia e incrementó la velocidad de la contracción en los animales envejecidos.

Por último, algunos autores han postulado que el NO podría ser un neuromodulador en vejiga ya que ciertos donantes de NO potencian las contracciones inducidas por EFS, en tanto que éstas se ven reducidas en presencia de inhibidores de NOS (Liu *et al.*, 1997). El hecho de que tanto la oxihemoglobina (secuestrador del NO) como inhibidores de la NOS originen hiperactividad del detrusor y disminuyan la capacidad vesical (Persson *et al.*, 1992; Nishizawa *et al.*, 1992) sugiere su implicación en ciertas patologías del tracto urinario inferior. Sin embargo, la presencia de fibras nNOS-inmuno-reactivas en nuestras preparaciones se ha visto limitada a la región del triángulo vesical en forma de gruesos troncos nerviosos, aparentemente fibras en paso, acompañados de un gran número de ganglios intramurales, tal y como ha sido descrito por otros autores (Andersson y Wein, 2004). Su densidad fue similar en ambas estirpes, lo que parece excluir al sistema nitrérgico como responsable de las modificaciones en la neuromodulación de la contractilidad vesical. Si bien una disminución de la biodisponibilidad del NO como consecuencia del fracaso en los mecanismos antioxidantes asociados a la vejez podría afectar al detrusor en SAM-P8, como se ha descrito en ratones transgénicos (con altos niveles de ión superóxido) envejecidos (Soler *et al.*, 2010). En nuestro estudio la inhibición de la NOS no alteraba significativamente la respuesta contráctil neurogénica de ninguna de las estirpes (datos no mostrados), descartándose en principio un papel del NO en el aumento de contractilidad vesical.

En resumen, la hipersensibilidad vesical a la estimulación neurogénica de las hembras envejecidas parece producirse por tres factores: una mayor liberación de ACh durante el impulso nervioso debida a alteraciones en la modulación de la neurotransmisión colinérgica, un incremento en la sensibilidad del músculo detrusor al ATP liberado, y la aparición de un componente prostanoide derivado de la ciclooxigenasa con efecto contráctil sobre el detrusor.

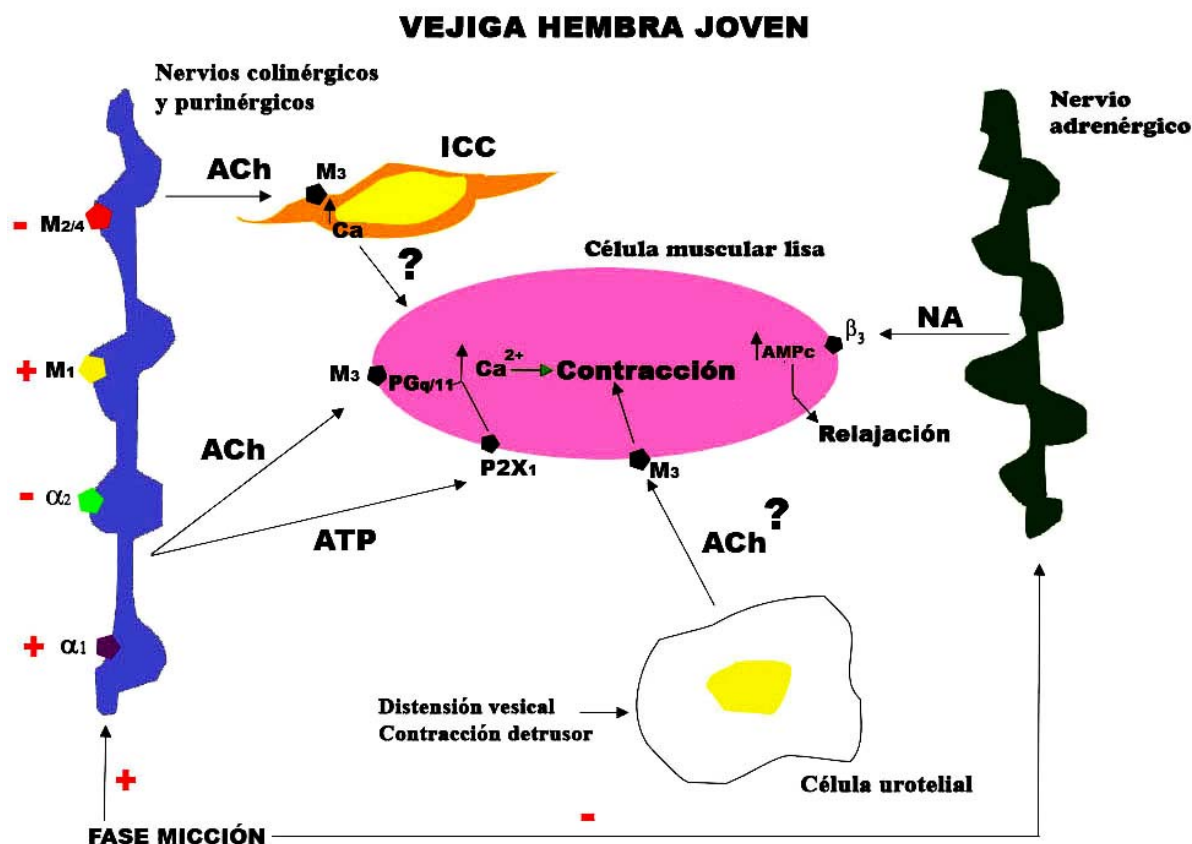


Figura XII. Representación esquemática de los principales mecanismos que regulan la contractilidad neurogénica vesical en ratones SAM-R1 hembra. La estimulación neurogénica induce la liberación predominante de ACh de los nervios colinérgicos que actuará sobre el músculo liso aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular e induciendo la contracción. A diferencia de los machos una parte importante de la contracción (30-40 % aproximadamente) también es debida a la liberación de ATP de nervios purinérgicos. Las ICCs vecinas al músculo liso podrían estar actuando como intermediarias de la neurotransmisión. La ACh también podría derivar de la capa urotelial en respuesta a la distensión vesical o la contracción del detrusor. A su vez los nervios colinérgicos presentan receptores presinápticos muscarínicos y adrenérgicos que facilitan (M_1 , α_1) o inhiben ($M_{2/4}$, α_2) la liberación de ACh.

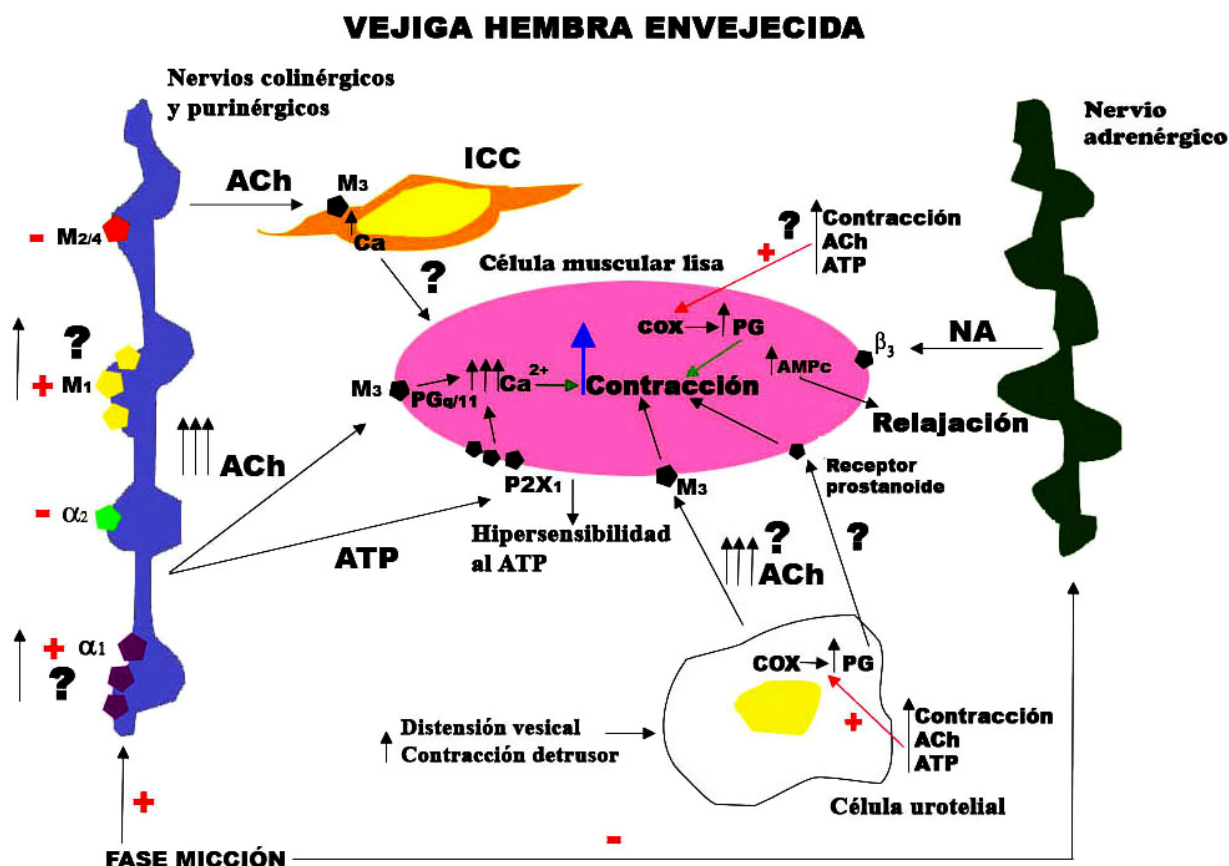


Figura XIII. Posibles alteraciones en la regulación de la contractilidad neurogénica vesical de los animales SAM-P8 hembras. Con el envejecimiento se produce un aumento de la contractilidad neurogénica vesical que podría ser debida a varios factores. El primero de ellos sería un aumento en la sensibilidad muscular al ATP liberado. No se modificó la densidad de innervación colinérgica ni la sensibilidad muscular a ACh, pero sí se sugieren posibles alteraciones en la neuromodulación de la neurotransmisión colinérgica a través de receptores M_1 o α_1 que lleven a una mayor liberación de ACh. Alternativamente el aumento de la producción de ACh podría derivar del urotelio. Además parece producirse un nuevo factor contráctil de carácter prostanoide derivado de la COX, cuya síntesis, en la propia célula muscular o en el urotelio, podría activarse por ACh, ATP o contracción muscular incrementando aún más la contracción neurogénica vesical. (+: facilitación -: inhibición).

5.1.2. Efectos sobre las respuestas neurogénicas en el macho

En cuanto a la contractilidad vesical en los machos SAM-P8, la EFS también originó respuestas contráctiles de mayor magnitud que en los animales SAM-R1, alcanzando además la máxima respuesta a frecuencias más bajas. Estos resultados coinciden con estudios previos en humanos donde la hiperactividad del detrusor se acompaña de un aumento en la contractilidad neurogénica vesical en ambos sexos (Eaton y Bates, 1982; Kinder y Mundy, 1987). La menor inhibición por atropina en machos SAM-P8 señala que el predominio colinérgico de la contracción neurogénica disminuye con el envejecimiento, en contraste con lo que sucedía en las hembras. La abolición de la respuesta residual con $\alpha\beta$ -metilen-ATP indica además que en los machos la hipersensibilidad a la estimulación neurogénica es causada principalmente por una mayor liberación de ATP o por una mayor sensibilidad del músculo detrusor al mismo, sin la participación de derivados de la COX. En el estudio de Yoshida *et al.* (2001), en el que se describe un aumento en la neurotransmisión purinérgica y un descenso en la colinérgica vesical con la edad, 25 de las 27 muestras utilizadas provenían de pacientes varones, lo que coincide con nuestros resultados y refuerza la hipótesis de que esta disminución en el componente colinérgico se produzca especialmente en el género masculino.

De igual forma que en las hembras, la comparación de la densidad de innervación colinérgica entre machos SAM-R1 y SAM-P8 no muestra diferencias significativas entre ambos grupos, indicando que no es una denervación del detrusor la que causa la disminución del dominio colinérgico en la contracción neurogénica vesical del ratón macho envejecido. Paradójicamente, la adición de ACh exógena muestra que aunque la contracción máxima es similar entre ratones jóvenes y viejos, la respuesta media se consigue a concentraciones más bajas en SAM-P8 que en SAM-R1, indicando hipersensibilidad del músculo detrusor envejecido de los machos a la ACh. Estos datos muestran de nuevo diferencias de género en el envejecimiento vesical. Aunque la mayoría de los estudios sobre el tema apuestan por que no se producen cambios en la capacidad de repuesta del detrusor a la ACh con el envejecimiento, como hemos descrito en el apartado de las hembras, cabe mencionar que en la gran cantidad de estudios existentes sobre el tema se dan no sólo diferencias de especie a este respecto sino también de estirpe (Kolta *et al.*, 1984; Zhao *et al.*, 2010; Ordway *et al.*, 1986; Lluell *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2005; Lluell *et al.*, 2003a; Lagou *et al.*, 2006b; Lai *et al.*, 2007).

Esta hipersensibilidad podría producirse por un aumento en el número de receptores muscarínicos de la capa muscular como mecanismo compensatorio de la disminución en la liberación de ACh con la edad descrita en humanos (Yoshida *et al.*, 2004), aumento que se ha observado en ratas envejecidas (Kolta *et al.*, 1984). Alternativamente, el

número de receptores podría mantenerse constante pero se podría modificar el subtipo expresado. En ratas Sprague-Dawley se ha descrito un desplazamiento funcional del subtipo M₃ al M₂ con el envejecimiento limitado a los machos (Ruggieri y Braverman, 2006; Michel y Barendrech, 2008) de forma similar a nuestros hallazgos.

Al igual que a la ACh, la sensibilidad al ATP aumenta en machos SAM-P8, siendo el principal responsable de la hipersensibilidad neurogénica vesical. Yoshida *et al* (2004) han descrito igualmente un incremento en la liberación de ATP en vejiga de pacientes humanos, lo que sugiere modificaciones en la actividad de las ecto-ATPasas frente a cambios en la población de receptores. Recientemente se ha descrito que la activación de los receptores purinérgicos P2X₁ inhibe, parcialmente, la contracción muscarínica (Heppner *et al.*, 2009) sugiriendo una posible explicación a la reducción del componente colinérgico por el ATP. Según estos autores, la despolarización en el inicio de la contracción por el ATP podría estar inhibiendo los canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes tipo L y reduciendo así la excitabilidad muscarínica. Sin embargo, estos hallazgos no concuerdan con el presente estudio en el que aumenta simultáneamente la sensibilidad a ambos agonistas.

Por otra parte se ha observado que la vejiga de los ratones macho SAM-P8 presenta una densidad de innervación nitrérgica y adrenérgica significativamente menor que la control, en concordancia con lo observado en machos de rata Wistar (Warburton y Santer, 1994; Mohammed y Santer, 2001). Estos datos sugieren una menor liberación de NA y de NO en el detrusor del macho con el envejecimiento. También en el tracto gastrointestinal de ratas macho se ha observado una reducción en el número de fibras nerviosas adrenérgicas con el envejecimiento (Baker *et al.*, 1991; Phillips *et al.*, 2006). Esta menor liberación de NA podría además ser otra de las causas que alterara la participación colinérgica en la contracción neurogénica vesical en machos SAM-P8, de forma similar a la facilitación de la liberación de ACh de los nervios colinérgicos, previamente comentada en las hembras. A través de receptores β-adrenérgicos la NA es capaz de originar relajación vesical, por lo que su disminución en machos SAM-P8 podría estar relacionada con una menor relajación vesical, y por tanto menor capacidad, durante la fase de continencia. A ello habría que añadir que la disminución de innervación adrenérgica del trigono podría originar un cierre vesical incompleto en los machos SAM-P8 y con ello pérdidas de orina.

Dado que en este género tampoco se han observado diferencias en las respuestas contráctiles inducidas por EFS en presencia de L-NOARG (datos no mostrados) se puede descartar que la disminución de innervación nitrérgica del detrusor SAM-P8 tenga un efecto directo sobre la contractilidad del músculo liso envejecido, pudiendo tener el NO una implicación diferente en los procesos de hiperactividad vesical, de forma similar a lo sugerido en las hembras.

contractilidad neurogénica es debida a la liberación de ACh y ATP de los nervios colinérgicos y purinérgicos que actuarían sobre el músculo liso aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular e induciendo la contracción. A diferencia de las hembras el componente colinérgico es predominante. Aquí también las ICCs vecinas al músculo liso podrían estar actuando como intermediarias de la neurotransmisión y parte de la ACh liberada podría derivar de la capa urotelial en respuesta a la distensión vesical o la contracción del detrusor. Asimismo los nervios colinérgicos presentarían receptores presinápticos muscarínicos y adrenérgicos facilitando (M_1 , α_1) o inhibiendo ($\text{M}_{2/4}$, α_2) la liberación de ACh.

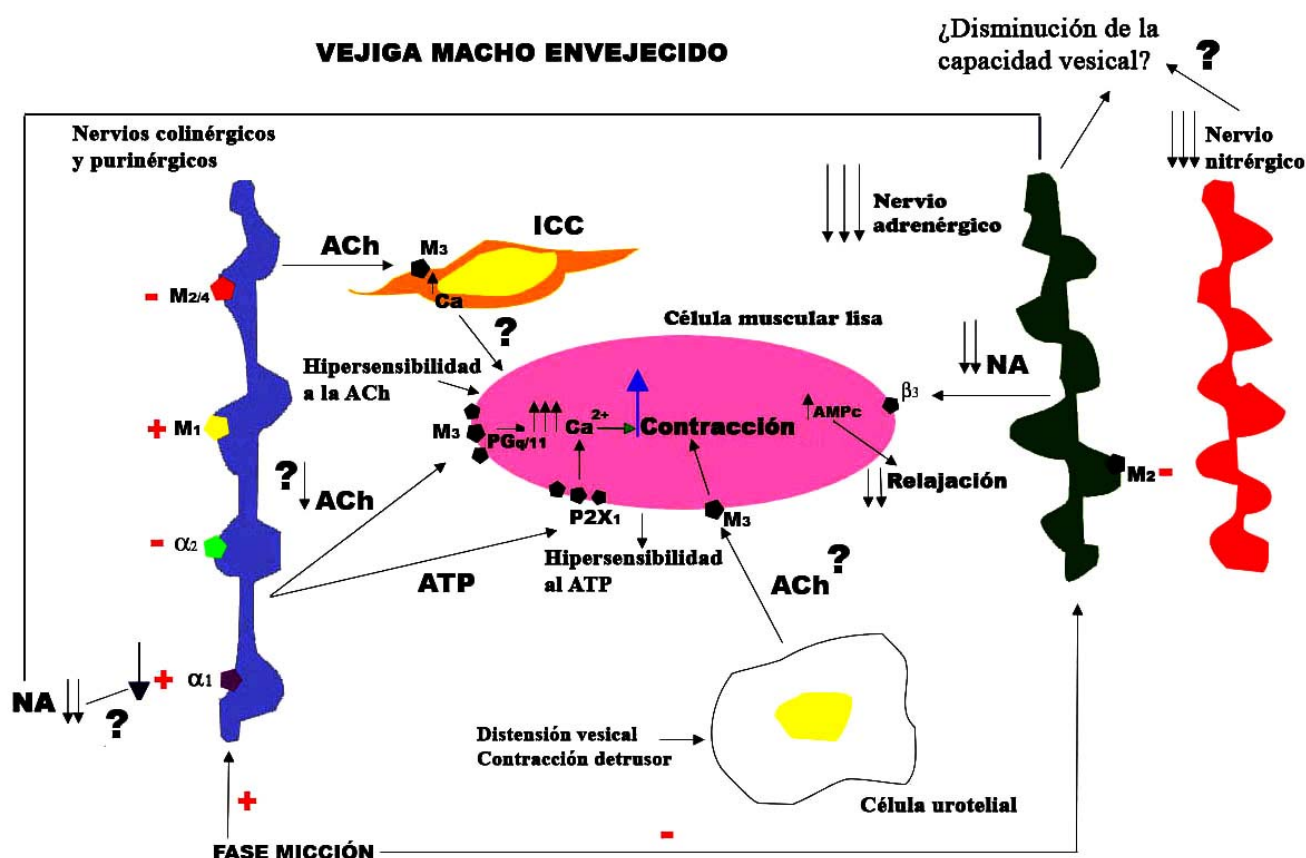


Figura XV. Posibles alteraciones en la regulación de la contractilidad neurogénica vesical de los animales SAM-P8 machos. En este género también se produce un aumento claro de contractilidad neurogénica que parece ser en gran medida de carácter purinérgico, debido probablemente a un aumento en la sensibilidad muscular al ATP. A pesar de la reducción en el componente colinérgico, el músculo envejecido presentó hipersensibilidad a la ACh que podría actuar como mecanismo compensatorio de una posible disminución en la liberación de ACh, que podría derivarse de alteraciones en la modulación presináptica de la inervación colinérgica. La reducción en la inervación adrenérgica podría originar una menor activación de los receptores presinápticos α_1 en nervios colinérgicos. Por otra parte la denervación adrenérgica y nitrérgica podrían afectar a la capacidad de la vejiga durante la fase de continencia y al adecuado mecanismo de apertura y cierre del cuello vesical. (+: facilitación -: inhibición).

5.2. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN LA CAPA MUSCULAR DE LA URETRA

Los estudios realizados en la uretra se han centrado en la uretra femenina. Desde un punto de vista estructural, la uretra SAM-P8 ha mostrado una distribución y grosor de las capas musculares y un espesor de lámina propia similar al de la uretra control, sugiriendo que tampoco en este órgano se producen alteraciones estructurales con el envejecimiento que puedan estar afectando la funcionalidad del tracto urinario inferior. Estos resultados están en consonancia con los estudios llevados a cabo en otras especies animales (Russell *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 2000) y con lo observado en la vejiga. Sin embargo la mayoría de los estudios realizados en humanos muestran alteraciones en el volumen de tejido conectivo, de músculo liso o de fibras estriadas en la uretra envejecida (Strasser *et al.*, 2000; Huisman, 1983; Carlile *et al.*, 1988; Clobes *et al.*, 2008), indicando que, a diferencia de los ratones, no se puede descartar una influencia de estas modificaciones en la disfunciones urinarias asociadas a la vejez de la especie humana.

Al igual que en la vejiga, la contracción inducida por KCl en la uretra fue similar en ratones SAM-R1 y SAM-P8, indicando por tanto que el envejecimiento no afecta a los mecanismos contráctiles básicos uretrales. Resultados similares han sido descritos en humanos y otras especies animales (Chun *et al.*, 1989; Ordway *et al.*, 1986; Saito *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1991; Lluet *et al.*, 2003a).

En la uretra hemos analizado por separado las respuestas neurogénicas contráctiles y relajantes. Las primeras han sido estudiadas en preparaciones pretratadas con el inhibidor de NOS L-NOARG, con objeto de inhibir las influencias relajantes nitrérgicas; y las segundas en presencia de atropina y guanetidina con objeto de bloquear la activación colinérgica y adrenérgica contráctil, respectivamente. En ambos casos la presencia del bloqueante nicotínico d-tubocurarina permite eliminar la posible interferencia en las respuestas de la estimulación de los nervios somáticos y por lo tanto de la musculatura estriada presente en la preparación.

La contracción neurogénica uretral inducida por EFS en ambas estirpes estaba formada por dos componentes, uno inicial más rápido que aparece aproximadamente a las frecuencias medias, y otro más lento y secundario que es notable desde el inicio de la curva frecuencia-respuesta. Aunque se ha descrito previamente un patrón similar de contracción neurogénica en la uretra del conejo y del hombre (Mattiason *et al.*, 1985; Deplanne *et al.*, 1998), éste el primer estudio que demuestra su existencia en el ratón, presentando a esta especie como un buen modelo para el estudio de la misma. Está ampliamente aceptado que durante la fase de continencia el cierre de la uretra es dependiente de la actividad simpática, y que esta contracción adrenérgica uretral tanto en humanos como en otras especies está mediada principalmente por el receptor

adrenérgico α_1 (García-Pascual *et al.*, 1991a; Andersson, 1993; Canda *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2000). Nuestro trabajo confirma este hecho en el ratón, ya que la adición del antagonista α adrenérgico fentolamina bloqueó la contracción neurogénica. La densa red de nervios adrenérgicos distribuidos uniformemente a lo largo de toda la uretra de forma similar a lo descrito en otras especies (Andersson y Wein, 2004), constituyen la base estructural desde donde la liberación de NA controla la actividad muscular uretral.

No obstante, hay que señalar la persistencia de una pequeña respuesta contráctil resistente a fentolamina y también al bloqueante de los canales de sodio TTX, lo que nos permite descartar la liberación conjunta de algún otro neurotransmisor y sugiere que sea debido a una estimulación directa de las fibras musculares lisas por el propio estímulo eléctrico. Estos resultados contrastan con los obtenidos en conejo y humano, donde el componente rápido de la contracción, que es resistente a fentolamina y a atropina, es abolido por TTX (Mattiason *et al.*, 1985). No obstante, en la uretra humana se ha observado una gran variabilidad en la sensibilidad de las preparaciones a la TTX, y en un 25% de las mismas este inhibidor potenciaba la respuesta contráctil en lugar de inhibirlas (Mattiason *et al.*, 1985). Otros autores han descrito en el conejo (Deplanne *et al.*, 1998) una inhibición significativa de dicho componente por atropina (sugiriendo la participación de la ACh) así como la presencia de un componente TTX-resistente, que estos autores sugieren es debido a la participación de canales de Ca^{2+} en la liberación de algún otro neurotransmisor. Este mecanismo ha sido descrito en nervios simpáticos del bazo del gato (Kirpekar y Prat, 1978). En nuestro caso el hecho de que esta respuesta no fuera modificada al someter a las preparaciones a una solución Krebs libre de Ca^{2+} (resultados no mostrados) descarta esta idea apoyando la hipótesis de la estimulación directa de las fibras musculares lisas.

En los animales envejecidos se produjo un aumento en la magnitud de la contracción a las altas frecuencias de estimulación, donde predomina el componente rápido. Estos resultados contrastan con los obtenidos en rata, donde el envejecimiento no parece inducir ninguna alteración en la contracción uretral (Lluel *et al.*, 2003a), señalando de nuevo diferencias entre estas dos especies en el proceso de envejecimiento del tracto urinario inferior. En nuestro estudio, no se han encontrado diferencias significativas en la densidad de inervación adrenérgica entre ambas estirpes, aunque otros autores han descrito una leve denervación adrenérgica con el envejecimiento en uretra de ratas macho (Warburton y Santer, 1994). Este hecho unido a la potenciación observada de la contracción inducida por NA exógena a las dosis más elevadas en SAM-P8, sugiere que el aumento de la contractilidad inducido por EFS a altas frecuencias tengan un origen muscular, probablemente relacionado con un aumento en el número de receptores α_1 -adrenérgicos lo que incrementaría la sensibilidad a la NA liberada de los nervios. Apoyando esta hipótesis ha sido detectado con el envejecimiento un aumento en la sensibilidad a fenilefrina en uretra de conejos y perros (Yoshida *et al.*, 1991; Suzuki *et*

et al., 1999) aunque sin alteraciones en la distribución del receptor α_{1L} -adrenérgico (Suzuki *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2000), sugiriendo la participación de otro subtipo.

Al igual que en otras especies (Sergeant *et al.*, 2000; García-Pascual *et al.*, 2008; Van der AA *et al.*, 2004) hemos observado la existencia de una densa red de ICCs en la capa muscular de la uretra de ambas estirpes de ratones. En la uretra de conejo se ha sugerido que las ICCs podrían tener un papel marcapasos del tono miogénico uretral de forma similar a su papel en el tracto gastrointestinal (Sergeant *et al.*, 2006; McHale *et al.*, 2006), y que además podrían mediar la neurotransmisión excitatoria de este órgano. Así, la inhibición de los canales de Cl^- , presentes en estas células pero no en miocitos, al menos en la especie estudiada, reduce tanto la actividad espontánea del órgano como las contracciones neurogénicas (Sergeant *et al.*, 2002), mientras que la adición de agonistas α -adrenérgicos parece aumentar su actividad marcapasos (Sergeant *et al.*, 2006). En nuestras preparaciones la estrecha relación entre las ICCs y los nervios adrenérgicos uretrales apoya esta hipótesis. Sin embargo el hecho de que la capa muscular de la uretra SAM-P8 muestre una reducción significativa en la densidad de ICCs parece excluir una participación de estas células en el incremento de contractilidad asociado al envejecimiento. No obstante, existe la posibilidad de que la reducción de ICCs con el envejecimiento sea selectiva del tipo no involucrado en el proceso de neurotransmisión adrenérgica, tal como se postula para la mediación de la neurotransmisión nitrérgica (ver más adelante). Por último, no se puede descartar que la disminución en el número de ICCs en los animales envejecidos sea la causa de una reducción en la actividad espontánea y en el tono miogénico uretral, los cuales podrían ser parcialmente responsables de la alta prevalencia de incontinencia urinaria durante la vejez. En este sentido, podríamos contemplar al aumento de contractilidad neurogénica como un mecanismo compensatorio de esta pérdida de continencia. De manera similar, una menor densidad de ICCs con el envejecimiento ha sido descubierta recientemente en el estómago y colon de humanos (Gómez-Pinilla *et al.*, 2011), y ha sido directamente relacionada con los cambios en la motilidad gastrointestinal asociados a la vejez.

El presente estudio también muestra una estrecha relación entre las ICCs y la innervación colinérgica uretral, lo que podría sugerir que el papel intermediario de estas células se extendiera también a la transmisión colinérgica. El papel de la ACh en la uretra es controvertido. Se ha sugerido que el efecto de la ACh se centra en la capa de músculo longitudinal, interpretándose que durante la micción la uretra acortaría su longitud favoreciendo el paso de la orina (Andersson y Wein, 2004). Por otro lado, se admite que la ACh en la uretra actúa como neuromodulador inhibiendo presinápticamente la liberación de NA (Andersson y Wein, 2004). Ambos efectos favorecerían la eliminación de orina durante la micción en la que predomina la activación parasimpática. Sin embargo, en nuestro estudio no se han detectado respuestas neurogénicas colinérgicas, a pesar de haber empleado preparaciones

longitudinales ni se han observado diferencias en la densidad de innervación colinérgica con el envejecimiento.

La respuesta relajante neurogénica uretral, a diferencia de la contráctil fue de menor magnitud a las altas frecuencias de estimulación en los animales envejecidos, sugiriendo una posible disfunción en la capacidad relajante del músculo liso uretral con el envejecimiento que podría estar provocando un inadecuado vaciamiento de la vejiga durante la micción. El hecho de que esta respuesta sea inhibida por L-NOARG en ambas estirpes demuestra el origen nitrérgico de la misma, según lo establecido previamente (García-Pascual *et al.*, 1991b; Andersson *et al.*, 1992; Triguero *et al.*, 1993; Persson *et al.*, 2000). En concordancia, los estudios de inmunofluorescencia muestran la presencia de una densa red de nervios nitrérgicos en la capa muscular de ambas estirpes de ratones, discurriendo de forma paralela a las fibras musculares lisas, y acompañados ocasionalmente de pequeños ganglios intramurales, como ha sido observado en la pared uretral de diversas especies animales y del hombre (McNeil *et al.*, 1992; Zygmunt *et al.*, 1993; Triguero *et al.*, 1993; Persson *et al.*, 1993; Leone *et al.*, 1994; Zhou y Ling, 1998).

La densidad de innervación nitrérgica fue menor en la uretra de los animales SAM-P8, sugiriendo que una reducida innervación nitrérgica podría ser la responsable directa de la disminución de la respuesta relajante neurogénica observada en los estudios funcionales. En concordancia con nuestros resultados se ha observado una reducción similar en la relajación nitrérgica en el músculo liso intestinal envejecido (Takeuchi *et al.*, 1998) y en la disfunción urinaria asociada a la diabetes (Mumtaz *et al.*, 1999b), y se ha detectado una disminución en los niveles de NO disponibles en el tracto gastrointestinal con el envejecimiento (Mármol *et al.*, 2009).

En uretra de conejo tanto la liberación de NA como la contracción aumentan al inhibir la NOS (Yoshida *et al.*, 2003), sugiriendo una modulación presináptica de la liberación de NA por parte del NO. En SAM-P8 una menor liberación de NO originada por la disminución de innervación nitrérgica podría permitir una mayor liberación de NA y una potenciación de la contractilidad uretral durante el envejecimiento. Mediante doble marcaje adrenérgico-nitrérgico hemos observado como las fibras adrenérgicas y nitrérgicas discurren muy próximas de forma paralela a lo largo de toda la capa muscular, lo que permitiría una neuromodulación presináptica de los nervios adrenérgicos por parte del NO liberado desde los nervios nitrérgicos adyacentes. Sin embargo, el hecho de que el aumento de contracción neurogénica sea resistente a L-NOARG, nos permitiría descartar este mecanismo a favor de un mecanismo muscular directo.

En la hiperactividad vesical se ha demostrado que también se produce una disfunción de la vía NO/cGMP que explica el hecho de que diversos inhibidores de las PDEs

mejoren los trastornos urinarios asociados a esa condición (LUTS) (Morelli *et al.*, 2009). Ante una disminución de la producción o biodisponibilidad del NO, los inhibidores de PDEs aumentarían los niveles de cGMP disponibles en la uretra disfuncional restaurando la capacidad relajante del tejido. En nuestro estudio, el efecto relajante inducido por la adición de Sildenafil, inhibidor selectivo de la PDE5, no presentó diferencias entre ambas estirpes de ratones, sugiriendo que el envejecimiento no se acompaña de una alteración en los niveles de PDE5. Este hecho refuerza la hipótesis del papel de la denervación nitrérgica en la disminución de la relajación uretral, aunque no puede excluirse una alteración de otro subtipo de PDE. Se ha descrito que la isoforma PDE9, específica de cGMP, también está presente en tracto urinario de diversas especies (Wheeler *et al.*, 2005), sin embargo la falta de especificidad de los inhibidores de PDEs disponibles no permite determinar la isoforma de PDE que podría estar involucrada en dicha alteración. El hecho de que la relajación inducida por Sildenafil haya sido inhibida con ODQ, antagonista de la guanilato ciclasa soluble, confirma que el efecto de Sildenafil es específico sobre la vía NO/cGMP.

Al igual que ocurrió con Sildenafil, el efecto directo de DEA/NO no fue diferente entre ambas estirpes, aunque su sensibilidad a ODQ demuestra la participación de la producción de cGMP en su mecanismo de relajación, sugiriendo por lo tanto que el efecto postsináptico del NO no se modifica en la estirpe envejecida. Sin embargo, el análisis cinético de las relajaciones inducidas por EFS de baja frecuencia y larga duración o por NO exógeno, permitió observar como aún siendo de similar amplitud, éstas relajaciones son más rápidas en los animales SAM-P8, sugiriendo que sí existen cambios a nivel muscular en el efecto del NO. Además se ha comprobado como este aumento en la velocidad de relajación en SAM-P8 es reducido en presencia de ODQ o L-NOARG, demostrándose la implicación de la vía NO/cGMP en el mismo. Esta observación desenmascara una hipersensibilidad del músculo uretral envejecido al NO, que al coexistir con una menor innervación nitrérgica permitiría que no se modificara la relajación inducida por EFS de baja intensidad y se modificara menos de lo esperado por la pérdida de innervación nitrérgica la inducida por altas frecuencias. Esta hipersensibilidad muscular al NO podría ser interpretada como un mecanismo compensatorio inducido por la denervación nitrérgica que ocurre durante el envejecimiento.

Recientemente se ha propuesto que las ICCs podrían estar actuando también como intermediarias en la neurotransmisión inhibitoria nitrérgica de la uretra (García-Pascual *et al.*, 2008; Triguero *et al.*, 2009). Esta hipótesis se basa en diversas observaciones como la existencia de una estrecha relación anatómica entre estas células y los nervios nitrérgicos, la estimulación selectiva de las ICCs localizadas intramuscularmente por la liberación de NO de los nervios intramurales y la presencia de canales catiónicos operados por cGMP (CNG) principalmente en estas células los cuales parecen estar

implicados en la respuesta relajante neurogénica uretral. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis pues la reducción de la respuesta relajante neurogénica en la uretra SAM-P8 se vio acompañada de una disminución significativa no sólo de nervios nitrérgicos sino también de ICCs. Se ha sugerido que podría existir un efecto trófico entre las ICCs y los nervios intramurales, de tal forma que la ausencia del nervio determinaría la carencia de los factores tróficos necesarios para la expresión fenotípica de las ICCs y/o viceversa (de Jongh *et al.*, 2007b). En este contexto una reducción en la transmisión de las señales nitrérgicas desde las ICCs a las fibras musculares lisas podría colaborar en la reducción de la capacidad relajante de la uretra durante el envejecimiento.

Por inmunofluorescencia hemos confirmado como la exposición del tejido uretral a DEA/NO en presencia de inhibidores de PDE induce una acumulación intensa de cGMP tanto en la capa muscular como en la lámina propia de todas las regiones uretrales. Este cGMP se ha localizado principalmente en ICCs (en torno al núcleo, en tanto que la vimentina se localiza preferentemente en la periferia) que discurren muy próximas a los haces musculares reforzando la hipótesis de su mediación en la neurotransmisión inhibitoria. Resultados similares se obtuvieron en la uretra de la rata y la oveja sometidas a tratamiento con el donante de NO S-nitrocisteína, mientras que en preparaciones sometidas a EFS se detectó acumulación de cGMP tanto en ICCs como en células musculares lisas. Estos resultados han llevado a sugerir un papel efector del NO en ambos tipos celulares en un modelo de neurotransmisión en paralelo (García-Pascual *et al.*, 2008). Hasta el momento no se ha esclarecido porque la respuesta es diferente frente a NO exógeno (donante de NO) o endógeno (liberado de las terminaciones nitrérgicas). Tampoco se conoce cómo el aumento de cGMP en ICCs está relacionado con la relajación muscular. Recientemente se ha demostrado la presencia de CNGs, que se localizan en ICCs, pero no en células musculares lisas y cuya inhibición por L-cis-diltiazem inhibe por completo la relajación nitrérgica (Triguero *et al.*, 2009), sugiriendo su participación en el mecanismo que media entre la producción del nucleótido cíclico en ICCs y el efecto final de relajación. Además, el hecho de que en rata y oveja sólo la acumulación de cGMP que se produce en las ICCs intramusculares, pero no en las de la submucosa o la serosa, sea inhibida por L-NOARG o ODQ, sugiere la existencia de diferentes tipos funcionales de ICC, en los que sólo las ICCs intramusculares participarían como intermediarias del NO de origen neural (García-Pascual *et al.*, 2008).

Hay que señalar que la utilización de inhibidores de PDE para permitir la acumulación de cGMP en el tejido produjo una relajación directa que no pudo ser inhibida por ODQ, sugiriendo que es producido por otro mecanismo. El mismo efecto ha sido descrito en la uretra de la rata y la oveja, donde se sugiere la participación de cAMP. Al ser IBMX un inhibidor inespecífico de PDE, tanto de cGMP como de cAMP, es también capaz de acumular este segundo nucleótido (García-Pascual *et al.*, 2008). Sin embargo, en estas preparaciones sometidas únicamente a tratamiento con los inhibidores

de PDE, IBMX y zaprinast, no se detectó acumulación significativa de cGMP por inmunofluorescencia. Al añadir DEA/NO o someter las preparaciones a EFS de larga duración, sobre este efecto inespecífico la respuesta relajante se hace más rápida, siendo este aumento de velocidad inhibido por ODQ y/o L-NOARG y por lo tanto atribuido a la producción de NO y a la acumulación de cGMP. Esta acumulación fue en este caso visible por inmunofluorescencia fundamentalmente en ICCs.

Hay que destacar que no hemos encontrado diferencias significativas en la distribución, localización e intensidad de la acumulación de cGMP en la red de ICCs uretrales de ambas estirpes de ratones sometidas al efecto de DEA/NO. Este efecto contrasta con la existencia de un menor número de ICCs reactivas a vimentina en la uretra de ratonas SAM-P8. Podría argumentarse que dada la existencia de subtipos funcionales de ICCs, y el hecho de que no todas las ICCs positivas a vimentina lo son para cGMP y viceversa, las ICCs que disminuyen en la uretra de los animales envejecidos no pertenezcan al subtipo que media la respuesta a NO a través de aumentos en el cGMP intracelular. Esta hipótesis supondría un efecto diferencial del envejecimiento sobre los distintos tipos de ICCs, en el que las ICCs especializadas en mediar la relajación nitrérgica se verían menos afectadas, salvaguardando la función de relajación uretral a pesar de la reducción en innervación nitrérgica.

En resumen en el músculo uretral envejecido se produce un incremento de contractilidad de origen adrenérgico debido a un aumento de la sensibilidad del músculo liso a la NA, que se acompaña de una disminución en la capacidad relajante neurogénica. Este segundo efecto es debido probablemente a una reducción en la innervación nitrérgica aunque estaría en parte compensado por una hipersensibilización del tejido al NO. Estos hechos podrían dar lugar a una deficiente relajación de la uretra durante la micción dificultando por tanto el correcto vaciamiento de la vejiga. Además, la reducción en el número de ICCs en la capa muscular de la uretra envejecida podría colaborar en la disminución del tono contráctil uretral al reducirse su función como marcapasos y/o su función mediadora de la neurotransmisión. No obstante la capacidad de las ICCs de acumular cGMP en respuesta a la estimulación nitrérgica no parece modificarse, siendo un posible mecanismo que actuaría también compensando el efecto de la reducción de la innervación nitrérgica, siendo la causa o el efecto de la hipersensibilización del tejido al NO.

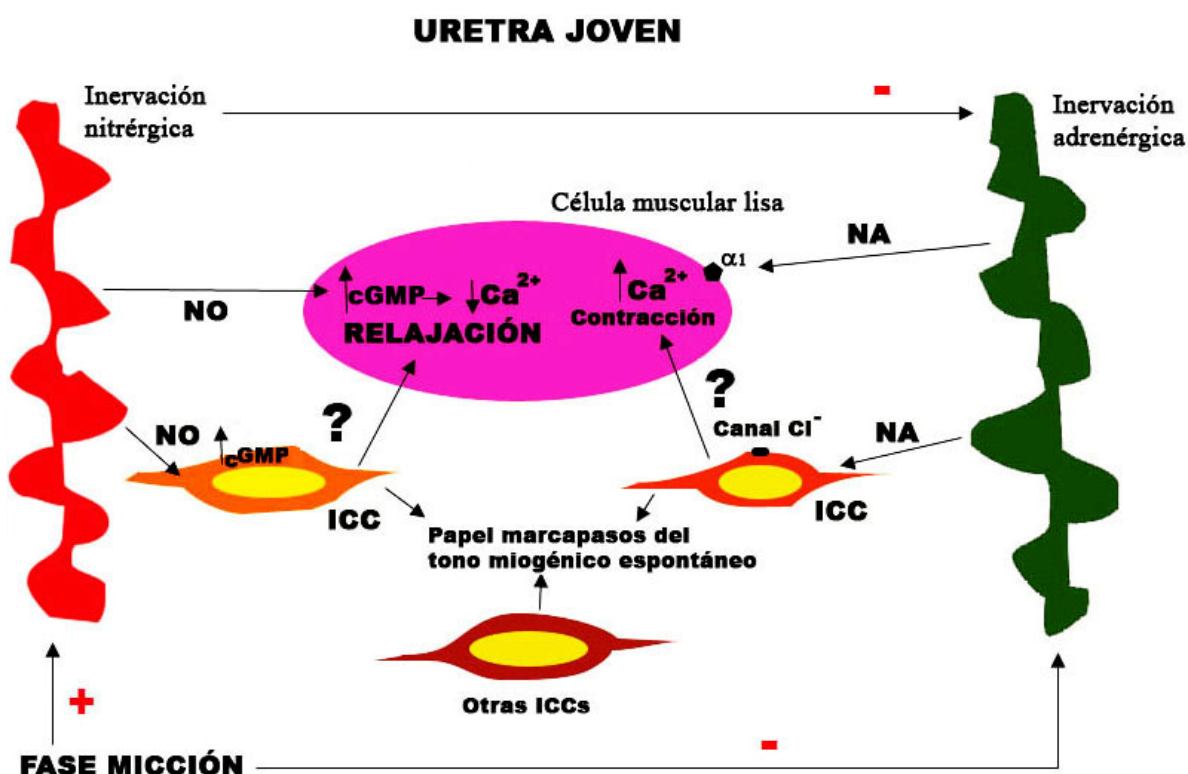


Figura XVI. Representación esquemática de los principales mecanismos que regulan la contractilidad neurogénica uretral en ratones SAM-R1. La uretra está sometida a un doble control adrenérgico y nitrérgico que median la contracción y relajación del tejido durante las fases de continencia y micción respectivamente. La neurotransmisión excitatoria adrenérgica mantiene el tono contráctil mediante la liberación de NA y su acción sobre los receptores α_1 -adrenérgicos del músculo. Durante la fase de micción el impulso parasimpático induce la liberación de NO de los nervios nitrérgicos, el cual actuará sobre el músculo liso uretral aumentando los niveles de cGMP y disminuyendo el Ca^{2+} intracelular con la consiguiente relajación muscular. Diferentes tipos funcionales de ICCs se localizan en la capa muscular uretral, con un papel marcapasos del tono miogénico espontáneo y/o como intermediarias de la neurotransmisión nitrérgica y/o adrenérgica.

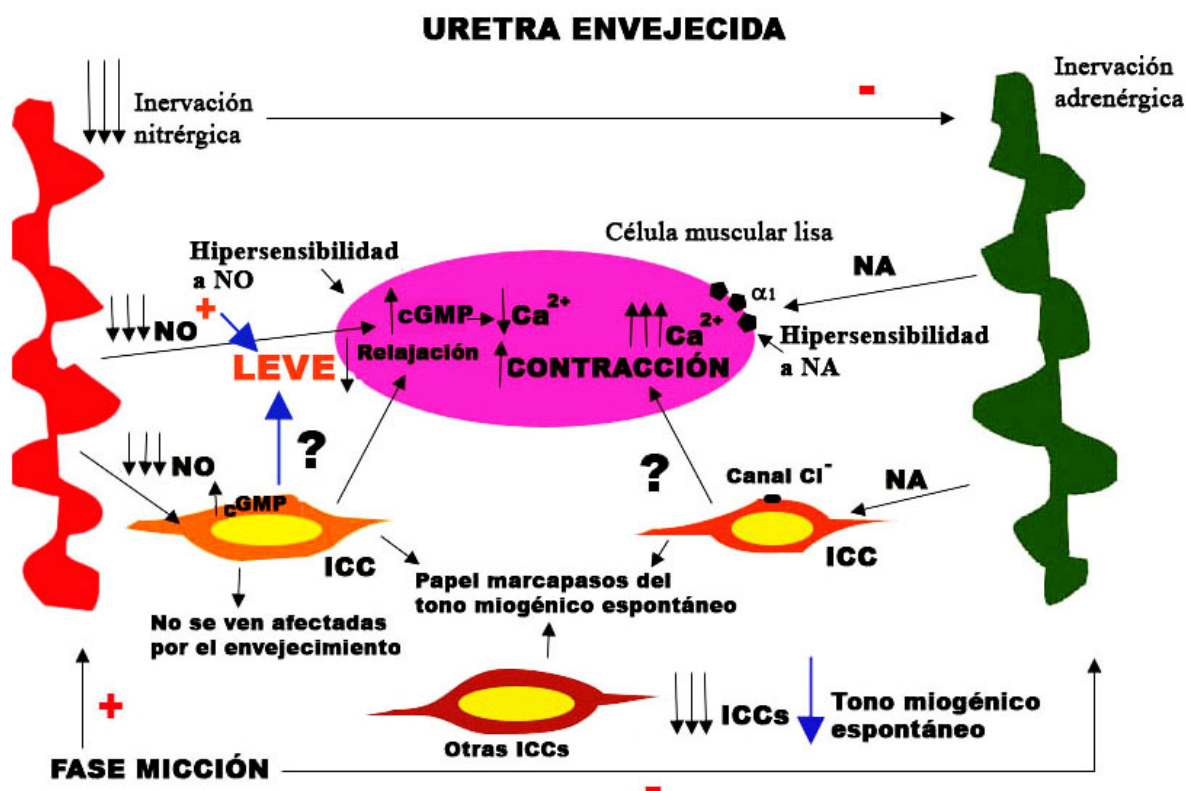


Figura XVII. Posibles alteraciones en la regulación de la contractilidad neurogénica uretral de los ratones SAM-P8. El envejecimiento se acompaña de un aumento de contractilidad adrenérgica en la uretra debido fundamentalmente a un aumento de sensibilidad muscular a la NA y a una disminución de la relajación nitrérgica. Ésta última se relaciona con una denervación nitrérgica que disminuye los niveles de NO liberados aunque este hecho podría estar en parte compensado por una hipersensibilidad del tejido al NO. Se produce además una disminución en la densidad de ICCs de la capa muscular que podría estar originando una reducción del tono miogénico espontáneo del órgano. No obstante, aquellas ICCs capaces de acumular cGMP en respuesta a NO no se modifican, mecanismo que actuaría también compensando la reducción de la innervación nitrérgica. (+: facilitación -: inhibición).

5.3. CAMBIOS INDUCIDOS POR EL ENVEJECIMIENTO EN LA LÁMINA PROPIA VESICAL Y URETRAL

Los estudios de inmunofluorescencia en la lámina propia vesical de los ratones SAM-R1, tanto hembras como machos, han confirmado la existencia de una densa red de nervios colinérgicos, adrenérgicos y nitrérgicos en esta capa en concordancia con estudios previos en diversas especies (Andersson y Wein, 2004). Esta red nerviosa se distribuye formando un plexo más escaso en la zona de la cúpula que va aumentando de forma progresiva su densidad al acercarse a la región del triángulo, donde es particularmente denso, a excepción de la innervación colinérgica en el macho que se distribuye de forma más uniforme. Una distribución similar ha sido descrita para la innervación aferente suburotelial inmunorreactiva a CGRP (Gabella y Davis, 1998). Su localización, distribución y proximidad con el urotelio sugiere una función aferente modulando el reflejo de micción, respondiendo a estímulos tales como la distensión vesical o mediadores químicos, sin poderse excluir no obstante un papel neurotrófico urotelial como han propuesto algunos investigadores (Dixon *et al.*, 2000).

El análisis de esta innervación en los ratones SAM-P8 muestra en ambos sexos un aumento significativo en la densidad de las fibras nitrérgicas y colinérgicas con el envejecimiento, en concordancia con la descripción previa de un aumento similar en las fibras nerviosas suburoteliales en pacientes con hiperactividad vesical (Smet *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1992). Se ha sugerido que esta hiperinnervación de la lámina propia pudiera ser responsable del aumento en las sensaciones vesicales de llenado, originando así aumento en la frecuencia miccional y urgencia (Andersson y Wein, 2004). Nuestros resultados en ratones SAM-P8 muestran también un aumento en el número de micciones totales y en las de pequeño volumen, indicativo de la existencia de urgencia miccional. El urotelio es capaz de responder a estímulos químicos del entorno (Brading y McCloskey, 2005; Fry *et al.*, 2007; Grol *et al.*, 2008) por lo que una mayor liberación de mediadores como ACh y NO en el envejecimiento podría activar a las células uroteliales, y éstas a su vez provocar un aumento del reflejo de micción o la contractilidad vesical (Apodaca *et al.*, 2007; Birder y de Groat, 2007). En respuesta a ACh las células uroteliales liberan ATP (Birder y de Groat, 2007) el cual parece activar los receptores P2X de las fibras sensoriales vecinas (Birder *et al.*, 2003; Burnstock, 2001) aumentando las sensaciones de llenado y dolor descrito en diversas patologías del tracto urinario (Birder *et al.*, 2003; Burnstock, 2001, 2006; Andersson y Hedlund, 2002).

Nuestro modelo nos ha permitido constatar también diferencias de género relevantes en la innervación suburotelial. Así, tanto la innervación nitrérgica como la colinérgica de la lámina propia no sólo es mayor en hembras SAM-R1 sino que su incremento en SAM-P8 es también superior al de los machos de la misma estirpe, lo que sugiere un mayor aumento de actividad sensorial inducido por el envejecimiento en este género, pudiendo

estar relacionado con la mayor prevalencia de disfunciones urinarias en el sexo femenino durante la senectud. En contraste, la densidad de inervación adrenérgica, similar en ambos sexos de SAM-R1, no parece estar alterada en las hembras SAM-P8 mientras que en los machos se reduce significativamente en la zona del trígono sugiriendo posibles diferencias en la funcionalidad de este plexo nervioso con respecto al nitrérgico y colinérgico. Esta reducción de fibras adrenérgicas suburoteliales en machos SAM-P8 podría reducir los niveles de NA en la proximidad del urotelio. Aquí, la NA podría, a través de receptores β -adrenérgicos uroteliales, activar a la eNOS y liberar NO (Birder *et al.*, 2002b), el cual modularía la actividad de los nervios aferentes o del músculo liso vesical (Birder y de Groat, 2007). De hecho, la disminución de NO próximo al urotelio induce hiperactividad vesical (Pandita, 2000), la cual también se presentó en machos SAM-P8.

En nuestro estudio hemos hallado una población de ICCs suburotelial en ratones SAM-R1 de ambos sexos, muy densa en el trígono, y que podrían amplificar información sensorial ya que generan corrientes de Ca^{2+} en respuesta a diferentes estímulos como la distensión vesical (Fry *et al.*, 2007), ATP (asociadas a corrientes de Cl^- - Ca^{2+} dependientes; Wu *et al.*, 2004), o NO, en este último caso reduciendo las corrientes de Ca^{2+} generadas por el ATP (Gillespie *et al.*, 2006). Asimismo, hemos observado un estrecho entrelazamiento de ICCs y células uroteliales, hecho ya descrito previamente y relacionado con el intercambio de señales entre ambas células (McCloskey, 2010), así como con nervios colinérgicos y adrenérgicos subepiteliales. Este hecho ha llevado recientemente a sugerir un posible papel de las ICCs como intermediarias entre las células uroteliales y las terminaciones nerviosas aferentes (Brading y McCloskey, 2005; Grol *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2004; McCloskey, 2010).

En nuestro estudio hemos observado un aumento muy significativo en la densidad de ICCs suburoteliales en SAM-P8 en ambos sexos, similar a los descritos en modelos de obstrucción vesical (Kubota *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Este incremento de ICCs podría alterar el reflejo de micción bien potenciando la transmisión de señales entre el urotelio y los nervios sensoriales, o bien actuando directamente sobre las terminaciones aferentes como auténticos mecanorreceptores (Huizinga *et al.*, 2008), siendo responsable, al menos en parte, de la hiperactividad vesical propia del envejecimiento y de la obstrucción vesical. Por otra parte, podrían aumentar la contracción vesical por su actividad marcapasos (Mazet and Raynier, 2004) reforzando aún mas la hiperreflexia vesical.

El reflejo de micción también puede ser facilitado por la activación de fibras aferentes uretrales por el paso de la orina, lo que lleva a un aumento en la contracción vesical (Chai y Steers, 1996). De hecho, Barrington (1915) describió una relación directa entre

la activación de estas fibras y la aparición de hiperactividad vesical en el gato, habiéndose observado recientemente el efecto inhibitorio de bloqueantes α -adrenérgicos sobre las fibras C aferentes uretrales, mejorando así la continencia urinaria (Yokoyama *et al.*, 2007). Por lo tanto los cambios de inervación a nivel de la lámina propia no sólo son importantes en la vejiga, también en la uretra desde donde se podría alterar la coordinación de la actividad vesico-uretral. En nuestro estudio, la uretra de ambas estirpes ha mostrado una densa red de fibras adrenérgicas, colinérgicas y nitrérgicas a nivel de lámina propia, distribuido uniformemente a lo largo de todo el tejido, a excepción de las fibras nitrérgicas, cuya densidad parece aumentar al llegar a la zona medial de la uretra. Al igual que en la vejiga, su papel funcional no está bien definido, sin embargo su proximidad al urotelio sugiere un papel sensorial. Asimismo se ha localizado una densa red de ICCs subepitelial que podrían modular la actividad de las fibras aferentes adrenérgicas y colinérgicas, con las que establecen estrecho contacto, disposición que también ha sido descrita en uretra de cobaya (Grol *et al.*, 2008). No obstante, y a diferencia de lo descrito en vejiga, el envejecimiento sólo parece inducir un aumento en la inervación nitrérgica uretral. Por lo tanto, aunque no podemos descartar una participación de la uretra en el aumento en las sensaciones de llenado y del reflejo de micción su participación sería notablemente menor que la vejiga.

Una red de ICCs subepiteliales inmunorreactivas a cGMP ha sido descrita previamente en la vejiga de la cobaya (Gillespie *et al.*, 2005) y en la uretra de la oveja (García-Pascual *et al.*, 2008), estando relacionada en estos casos con la presencia de células positivas para nNOS en las capas más basales del urotelio y sugiriéndose una posible transmisión de señales nitrérgicas entre estas dos estructuras, cuya función podría ser sensorial. En la uretra de la rata y la oveja se ha descrito que la acumulación de cGMP en respuesta a NO en las ICCs de la lámina propia no se ve modificada por el tratamiento con ODQ, sugiriendo que se trata de una acumulación inespecífica e independiente de la guanilato ciclasa (García-Pascual *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio, se observó una acumulación de cGMP (medido por inmunofluorescencia) en ICCs de la lámina propia en respuesta a DEA/NO que sí era efectivamente inhibida en preparaciones tratadas con ODQ, demostrando así la implicación de la vía NO/cGMP. Esta acumulación, sin embargo no se vio modificada por el envejecimiento, sugiriendo que no se producen alteraciones de la actividad guanilato ciclasa de las ICCs con la edad, de forma similar a lo descrito para la capa muscular.

Nuestro estudio también ha mostrado la acumulación cGMP en el urotelio en respuesta a la adición de DEA/NO, pudiendo constituir otra diana del NO liberado por los nervios nitrérgicos, y cuyo aumento podría alterar el reflejo de micción. El hecho de que la eliminación del urotelio disminuya la relajación nitrérgica inducida por EFS (Pinna *et al.*, 1996) y aumente la contractilidad adrenérgica de la uretra (Pinna *et al.*,

1996), así como que aumente las contracciones vesicales inducidas por EFS o ACh (Fry *et al.*, 2010), refuerzan su efecto modulador sobre la capa muscular subyacente.

SEÑALIZACIÓN SENSORIAL DE LA VEJIGA JOVEN

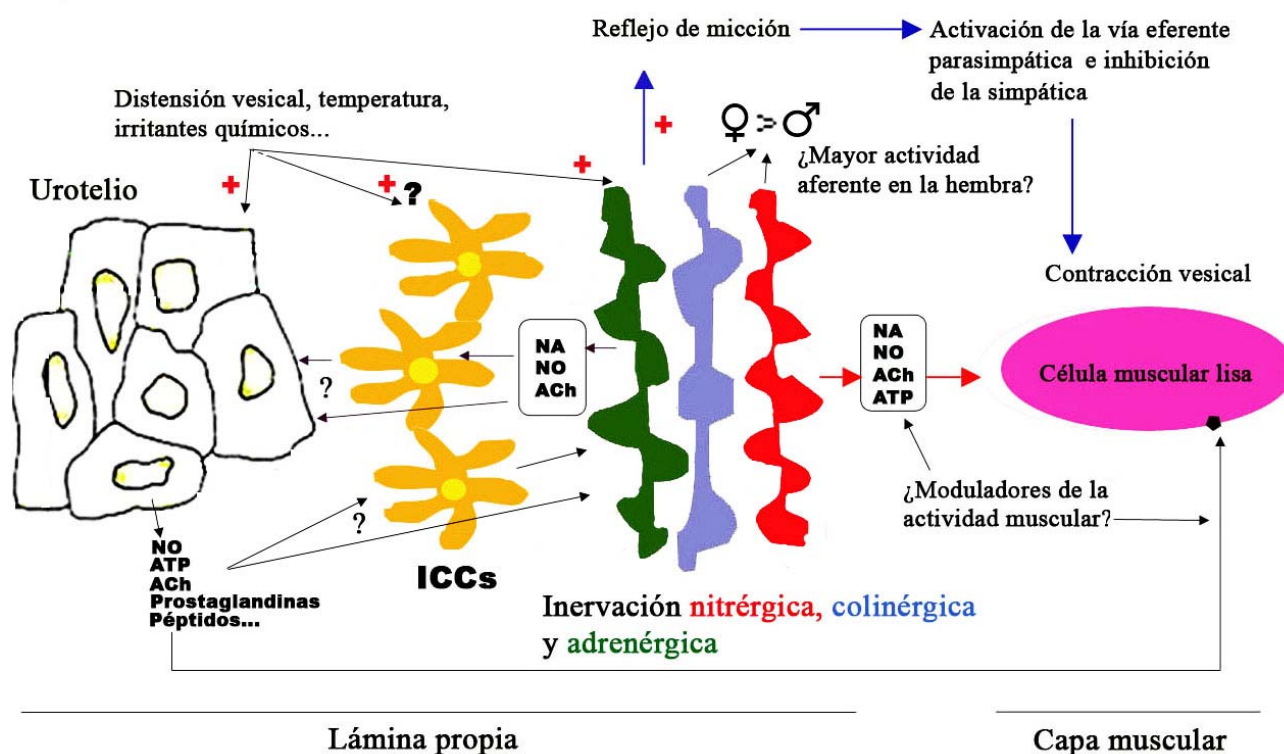


Figura XVIII. Representación esquemática de los principales mecanismos que regulan la señalización sensorial vesical ratones SAM-R1. La distensión vesical por el llenado de la orina activa los mecanorreceptores situados sobre los nervios aferentes induciendo el reflejo de micción, el cual activa la vía eferente parasimpática e inhibe la simpática induciendo la contracción vesical y relajación uretral. Asimismo en respuesta a la distensión vesical y a estímulos químicos son liberados diversos mediadores (ACh, NO, ATP, PGs...) por parte del urotelio y/o la inervación aferente que actúan modulando el reflejo de micción y la contractilidad muscular. Las ICCs suburoteliales actúan como intermediarias de las señales sensoriales amplificando la respuesta y mediando la señalización entre el urotelio y los nervios aferentes o la capa muscular y viceversa. Además las ICCs suburoteliales también podrían actuar como mecanorreceptores de la distensión vesical. La inervación colinérgica y nitrérgica de la lámina propia fue mayor en hembras que en machos sugiriendo una mayor implicación de la misma en el control de las sensaciones vesicales en la hembra.

SEÑALIZACIÓN SENSORIAL DE LA VEJIGA ENVEJECIDA

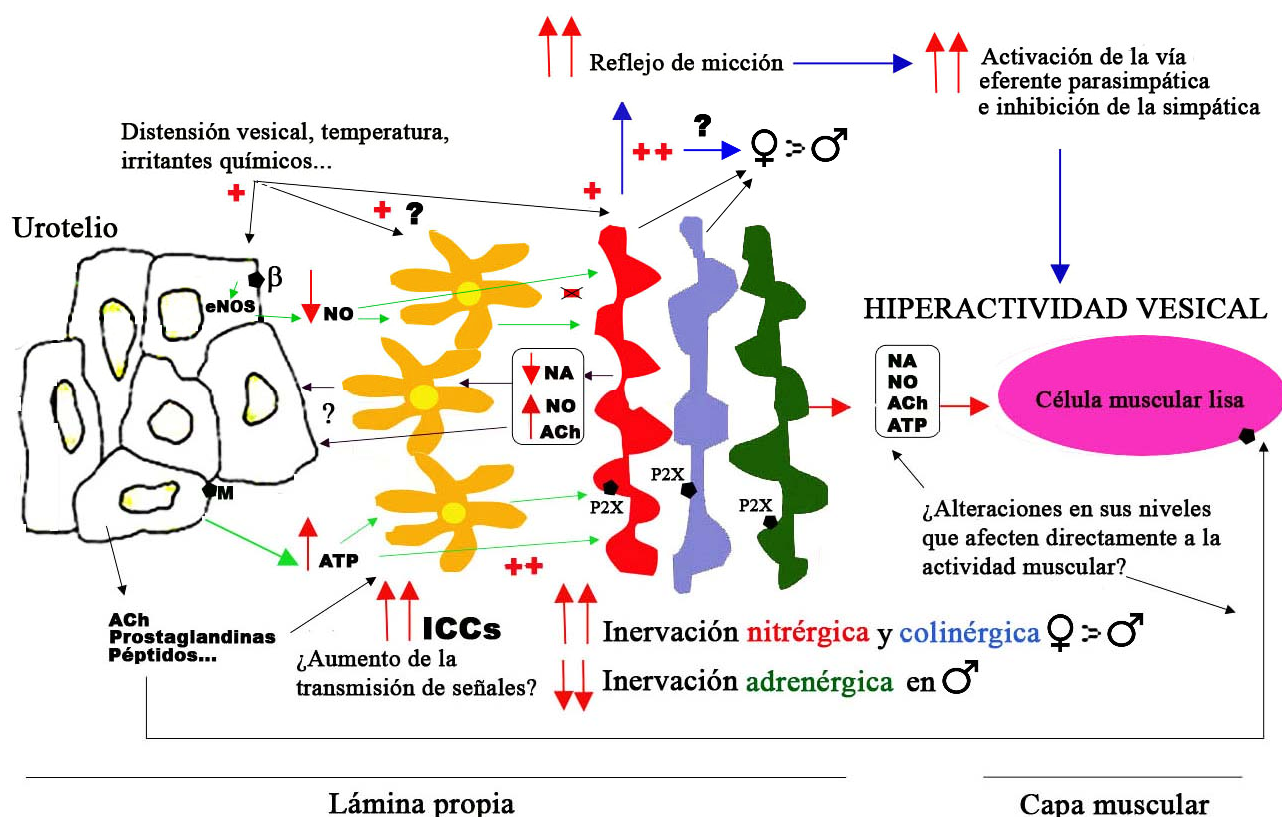


Figura XIX. Posibles alteraciones en la regulación de la señalización sensorial vesical de ratones SAM-P8. En la lámina propia el envejecimiento induce un aumento de innervación colinérgica y nitrérgica, así como una disminución de la adrenérgica exclusivamente en los machos, que podrían estar alterando el reflejo de micción y/o la actividad muscular bien directamente o bien indirectamente alterando la actividad de las células uroteliales. Un aumento en los niveles de ACh en el entorno urotelial incrementaría la liberación de ATP que actuaría sobre la innervación aferente aumentando el reflejo de micción. En los machos una disminución en los niveles de NA liberada en las cercanías del urotelio reduciría la liberación de NO por parte de las células uroteliales, cuyo efecto sobre la innervación aferente o capa muscular es probablemente inhibitorio, potenciándose por tanto la actividad vesical. Asimismo se produce un aumento en la densidad de ICCs suburoteliales en ambos sexos que podría estar potenciando aún más la señalización sensorial y el reflejo de micción y/o la contracción vesical. El mayor aumento de innervación colinérgica y nitrérgica en hembras que en machos envejecidos podría estar originando un incremento del reflejo de micción de mayor magnitud en este género. (+: facilitación -: inhibición).

5.4. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL ENVEJECIMIENTO EN EL CUERPO CAVERNOSO DEL PENE

Aunque la organización estructural del cuerpo cavernoso parece ser similar en SAM-R1 y SAM-P8, nuestro estudio ha mostrado que el envejecimiento se acompaña de un aumento drástico del área de los espacios lacunares presentes en este tejido, coincidiendo con los resultados obtenidos recientemente en rata (Costa y Vendeira, 2008). Pese a que no se ha realizado un análisis morfométrico cuantitativo, dichas variaciones parecen ser consecuencia de una pérdida de músculo liso trabecular similar a lo descrito en rata y hombres de edad avanzada (Wespes, 2000; Bakircioglu *et al.*, 2001; Costa y Vendeira, 2008; Ferrer *et al.*, 2010) lo cual podría modificar las propiedades mecánicas y hemodinámicas del pene, disminuyendo su capacidad eréctil.

De forma similar a lo descrito en vejiga y uretra, la respuesta contráctil inducida por KCl en el cuerpo cavernoso fue semejante en ambas estirpes de ratones, indicando que ni el envejecimiento en sí mismo ni las alteraciones estructurales descritas en el apartado anterior afectan a los mecanismos contráctiles intrínsecos. Aunque éste es el primer estudio que ha analizado posibles alteraciones en esta respuesta con el envejecimiento, cabe mencionar que en estudios sobre ED asociada a la diabetes se han obtenido resultados semejantes (Chang *et al.*, 2003), postulándose que la capacidad contráctil del cuerpo cavernoso se encuentra preservada en edades avanzadas.

5.4.1. Respuestas neurogénicas

El análisis de las curvas frecuencia-respuesta en preparaciones *in vitro* de cuerpo cavernoso de ratón de ambas estirpes permitió observar un incremento de la sensibilidad del cuerpo cavernoso a la estimulación neurogénica con el envejecimiento, especialmente evidente a frecuencias altas de estimulación.

Está firmemente establecido que el estado de detumescencia del pene es consecuencia de la liberación tónica de NA (Giuliano *et al.*, 1993), la cual actúa sobre los receptores α -adrenérgicos del músculo liso trabecular induciendo su contracción. En nuestro caso, la potente inhibición de la contracción por fentolamina, así como la presencia de una densa inervación adrenérgica alrededor de las trabéculas de músculo liso, confirman el papel fundamental del control adrenérgico en la respuesta contráctil neurogénica. El incremento observado en esta densidad de inervación en SAM-P8 sugiere que la hipersensibilidad neurogénica a EFS de alta frecuencia es debida a un aumento de los niveles de NA liberados y no a un aumento de sensibilidad del músculo liso trabecular a la misma, lo cual en contraste sí ha sido sugerido por otros autores (Christ *et al.*, 1991b; Ragazzi *et al.*, 1996). De hecho, el músculo liso del cuerpo cavernoso SAM-P8 presentó incluso hiposensibilidad a las dosis más bajas de NA,

sugiriendo la aparición con la edad de una alteración en su capacidad de respuesta a la misma. Esta disminución de la sensibilidad al efecto de NA podría a su vez ser el origen del aumento de inervación adrenérgica como mecanismo compensatorio. En apoyo de esta sugerencia, se ha descrito en pacientes con ED la presencia de elevados niveles plasmáticos de NA durante la estimulación sexual (Becker *et al.*, 2002), y en ratas diabéticas con ED tanto niveles plasmáticos de NA elevados como un incremento en la densidad de fibras adrenérgicas del tejido (Morrison *et al.*, 2007). El mantenimiento del tono contráctil adrenérgico de forma sostenida durante el periodo de detumescencia se ha asociado con la actividad RhoA/ROCK en el cuerpo cavernoso (Mas, 2010), la cual parece aumentar con la edad sin que haya modificaciones en su expresión (Bivalacqua *et al.*, 2004; Ming *et al.*, 2002). Este hecho explicaría que inhibidores de ROCK mejoren la disfunción eréctil (Rajasekaran *et al.*, 2005).

Por otra parte, la posible modulación presináptica de la liberación de NO por parte de NA (Simonsen *et al.*, 1997b; Saenz de Tejada *et al.*, 2000; Andersson, 2001a) podría tener lugar en el cuerpo cavernoso dada la estrecha relación entre nervios adrenérgicos y nitrérgicos. Por lo tanto, la elevación de los niveles de NA durante el envejecimiento podría reducir la liberación de NO, potenciando aún más la contracción del tejido y el estado de flacidez.

Mayoritariamente localizadas a nivel trabecular, la densa red de ICCs positivas a vimentina observadas en este estudio es similar a las previamente descritas (por inmunorreactividad a c-kit) en el cuerpo cavernoso de cobaya, conejo y humano (Hashitani *et al.*, 2005, 2006; Shafik, 2007). Dicha red podría participar en el mantenimiento de un tono miogénico alto, facilitando el estado de detumescencia (Hashitani, 2006), o en la mediación de la neurotransmisión excitatoria del mismo (Hashitani *et al.*, 2005). Si bien los miocitos del cuerpo cavernoso también presentan actividad espontánea (Montgomery y Fry, 1992; Karkanis *et al.*, 2003), las contracciones espontáneas del cuerpo cavernoso son inhibidas por indometacina (Christ *et al.*, 1990), y por inhibidores de la COX-2 (Hashitani *et al.*, 2005), cuya expresión es muy alta en las ICCs en tanto que muy débil o inexistente en células musculares (Hashitani, 2006). Por tanto se ha sugerido que la actividad miogénica en el cuerpo cavernoso podría ser dependiente de PGs liberadas desde las ICCs actuando así como marcapasos. Por otro lado, en el presente estudio, se observó la existencia de frecuentes contactos entre ICCs con nervios adrenérgicos y/o colinérgicos sugiriendo su participación como intermediarias en la neurotransmisión simpática y/o parasimpática colinérgica. No obstante, la ausencia de modificaciones significativas observadas en la densidad y distribución de ICCs con el envejecimiento parece descartar su implicación en las alteraciones de contractilidad observadas en SAM-P8.

Alternativamente, alteraciones en la expresión de nNOS en nervios intramurales del cuerpo cavernoso, como ha sido descrito en rata y conejo, sería una posible causa de reducción de la capacidad de relajación neurogénica de este tejido y por lo tanto de su capacidad eréctil (Carrier *et al.*, 1997; Numao *et al.*, 2007). En el presente estudio, hemos encontrado que las respuestas relajantes inducidas por EFS fueron similares en ambas estirpes, sugiriendo que, al menos en esta especie, la relajación neurogénica se encuentra preservada durante el envejecimiento. La inhibición de estas respuestas con L-NOARG confirma su naturaleza nitrérgica, en concordancia con lo establecido previamente (Andersson y Wagner, 1995). Además, hemos hallado una densa red de nervios nitrérgicos en íntima relación con las trabéculas musculares del tejido, que sustenta su intervención en la relajación de origen nervioso. De nuevo en contraste con lo descrito en rata (Carrier *et al.*, 1997), dicha inervación aumenta dramáticamente en SAM-P8 en concordancia con nuestros resultados funcionales. El hecho de que este incremento de inervación se acompañe de una respuesta relajante neurogénica similar en SAM-P8 sugiere una reducción en la sensibilidad del músculo trabecular a NO en estos animales, hipótesis que se ve reforzada por el desarrollo de una menor respuesta relajante a la administración exógena de donantes de NO. Una sobreexpresión de nNOS en los animales envejecidos podría actuar como un mecanismo compensador de esta hiposensibilidad, manteniendo en parte la función eréctil.

El análisis de la relajación sostenida inducida tanto por EFS de larga duración (4 min) como por la adición exógena de DEA/NO, en presencia de inhibidores de PDE, mostró igualmente que sólo las relajaciones inducidas por EFS pero no por DEA/NO fueron significativamente más rápidas en la estirpe SAM-P8, siendo este efecto inhibido por L-NOARG y ODQ, lo que demuestra la dependencia de NO de este efecto. Este hecho concuerda con la menor sensibilidad descrita para NO exógeno, mientras que las curvas de relajación frecuencia-respuesta no fueron diferentes en ambas estirpes. Hay que señalar que este efecto de hiposensibilidad a NO en el cuerpo cavernoso con el envejecimiento es el contrario al observado en la uretra donde se presentó hipersensibilidad a este mediador, tanto en respuesta a EFS como DEA/NO. No se conoce la razón de estas discrepancias, pero también se acompaña de un efecto contrario del envejecimiento sobre la densidad de inervación nitrérgica, aumentada en el cuerpo cavernoso pero disminuida en la uretra. Se podría por lo tanto sugerir la existencia de una relación inversa entre ambos parámetros, de forma que la sensibilidad muscular al NO sea inversamente proporcional a la cantidad de NO liberado de los nervios mediante algún tipo de regulación nervio-músculo. Este mecanismo permitiría adaptar y regular la respuesta postsináptica compensando así los cambios en la densidad de inervación, o viceversa.

Una reducción similar en la capacidad de respuesta del músculo trabecular a donantes de NO exógenos con el envejecimiento ha sido puesta de manifiesto previamente en

estudios desarrollados en conejo y rata en relación tanto con el envejecimiento como con la diabetes (Ragazzi *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 2001; Way y Reid, 1999). Este hecho concuerda con que en ambas situaciones se haya observado un aumento en los niveles de radicales superóxido en este tejido (Hirata *et al.*, 2009; Bivalacqua *et al.*, 2003b), sugiriendo que la disminución en los niveles de NO podría ser una consecuencia directa de su mayor “secuestro” por parte de ROS.

Una disminución de la sensibilidad al NO también podría ser el resultado de un aumento en los niveles de PDE5, la principal PDE responsable de la degradación de cGMP en el cuerpo cavernoso (Lue, 2003; Lin *et al.*, 2005), originando por lo tanto una degradación acelerada de este nucleótido y consecuentemente una disminución del efecto postsináptico del NO. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado como la respuesta relajante inducida tanto por Sildenafil, inhibidor específico de la PDE5, como por la combinación de IBMX, inhibidor no selectivo, y zaprinast, otro inhibidor selectivo de PDE5, fue similar en ambas estirpes. Aunque no podemos descartar la participación de alguna otra isoforma de PDE, tal como PDE1, 2, 3 y 9 que también han sido localizadas en este tejido (Küthe *et al.*, 2001), y que degradan cGMP en el mismo (Wheeler *et al.*, 2005), el hecho de que el inhibidor no selectivo IBMX produzca efectos similares en ambas estirpes, sugiere que la existencia de diferencias en los niveles de expresión o la activación diferencial de PDEs de cGMP durante el envejecimiento no parece ser responsable de la menor sensibilidad del músculo trabecular al NO. Por último, hay que señalar de forma similar a lo que ocurría en la uretra, que la administración de los inhibidores de PDE a las preparaciones de cuerpo cavernoso provocó también una relajación independiente de cGMP que ha sido relacionada con la acumulación de cAMP (García-Pascual *et al.*, 2008).

En concordancia con estos resultados funcionales ambos tipos de estimulación (EFS de larga duración y DEA/NO) indujeron una acumulación de cGMP similar en el cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8, presente en células musculares lisas pero especialmente en ICCs, lo que sugiere la participación de ambos tipos celulares, pero especialmente de las ICCs como efectores del NO tanto endógeno (EFS) como exógeno (DEA/NO). La inmunorreactividad a cGMP apareció de forma preferente en ICCs que rodeaban las trabéculas, en la proximidad de los nervios intramurales. Este marcaje sin embargo no se observó en condiciones control y tras la inhibición con ODQ y L-NOARG, lo que demuestra la especificidad de la respuesta. La colocalización observada de vimentina y cGMP en las mismas células confirma su naturaleza. De forma similar ICCs positivas a vimentina y a c-kit han sido previamente descritas en el cuerpo cavernoso humano y de otros mamíferos (Hashitani y Suzuki, 2004; Hashitani, 2006; Shafik, 2007), demostrando la especificidad de la vimentina como marcador de ICCs en este tejido. No obstante, parece ser que sólo una subpoblación de estas ICCs positivas a vimentina acumularon cGMP tras la estimulación con NO, las cuales estaban localizadas en los

bordes de las trabéculas musculares. Estos resultados sugieren la presencia de subpoblaciones de ICCs, con distinta especialización funcional, en concordancia con lo observado en uretra de la rata y la oveja (García-Pascual *et al.*, 2008) así como en el tracto digestivo (Ward *et al.*, 1994; Burns *et al.*, 1996). Como células efectoras del NO, en teoría, las ICCs podrían responder tanto al NO producido por el endotelio (eNOS) como por los nervios nitrérgicos intramurales (nNOS).

5.4.2. Funcionalidad endotelial

Está plenamente establecido que la ACh es uno de los principales factores que activa la liberación de los mediadores endoteliales que modulan la contractilidad del cuerpo cavernoso. Nuestro estudio confirma que la adición de ACh exógena induce una relajación a dosis bajas y contracción a las altas, sugiriendo la liberación tanto de agentes relajantes como contráctiles. La presencia en las trabéculas musculares y los espacios lacunares del cuerpo cavernoso en SAM-R1 y SAM-P8 de nervios colinérgicos productores de ACh próximos al endotelio apoya la posible participación de la liberación de mediadores endoteliales por acción de este neurotransmisor durante la descarga parasimpática.

Se ha postulado que durante el envejecimiento podría alterarse la relación de mediadores liberados por el endotelio con una mayor producción de agentes contráctiles que incrementarían el tono muscular del tejido (Koga *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 2009). Nuestros resultados apoyan dicha sugerencia ya que aunque no se han detectado alteraciones en la relajación inducida por la ACh sí se ha observado un aumento en la magnitud de la respuesta contráctil en la estirpe SAM-P8, sugiriendo un cambio en la sensibilidad del músculo trabecular a los agentes endoteliales liberados por la ACh, o en la cantidad o naturaleza de las sustancias liberadas por el endotelio. El hecho de que no se observen diferencias en la densidad de innervación colinérgica en SAM-R1 y SAM-P8 descarta *a priori* que los cambios sean debidos a una mayor liberación de ACh, reforzando la hipótesis de una alteración postsináptica a nivel muscular o endotelial.

La inhibición de ambas respuestas inducidas por ACh (relajante y contráctil) por atropina confirma que están mediadas, predominantemente, por receptores muscarínicos. Sin embargo, llama la atención la aparición de una nueva respuesta relajante a altas dosis de ACh en presencia de atropina. Por lo tanto, el bloqueo muscarínico desenmascara una relajación resistente. Recientemente se ha descrito en el cuerpo cavernoso del conejo que la nicotina induce una relajación, que es en última instancia debida a la liberación de NO, actuando sobre receptores nicotínicos presinápticos de los nervios nitrérgicos (Bozkurt *et al.*, 2007), y que este mismo efecto es conseguido con dosis altas de ACh en presencia de atropina. En concordancia con esta hipótesis, en el presente estudio hemos observado que los nervios colinérgicos y nitrérgicos discurren muy próximos entre sí,

llegando a contactar ambas fibras nerviosas en numerosos puntos, lo que hace posible la modulación mutua de los procesos de neurotransmisión. De esta forma, la ACh liberada en altas concentraciones, además de inducir la liberación de agentes endoteliales, también podría estar mediando la relajación del cuerpo cavernoso facilitando la liberación de NO de origen nervioso. Hay que añadir, que el bloqueo de los receptores adrenérgicos con fentolamina en preparaciones contraídas con AVP, también desenmascaró una respuesta relajante a dosis altas de ACh, que sin embargo no fue inhibida por L-NOARG. Aunque no hemos comprobado la sensibilidad a L-NOARG de la relajación resistente a atropina, es posible que sea igualmente independiente de NO. Estos resultados en conjunto sugerirían la liberación endotelial de un factor relajante no nitrérgico, cuyo efecto es desenmascarado por el bloqueo muscarínico y/o adrenérgico. Se precisarían más estudios para analizar la naturaleza y origen de este factor, pero en cualquier caso su participación no se vio modificada por el envejecimiento, observándose los mismos resultados en ratones SAM-R1 y SAM-P8.

La relajación muscarínica endotelial inducida por ACh fue totalmente inhibida con L-NOARG indicando que dicha respuesta es debida a la producción de NO tras la estimulación colinérgica del endotelio. La presencia de eNOS en el endotelio que reviste los espacios lacunares está bien documentada en diversas especies sustentando la producción de NO por el endotelio y en la vecindad de las trabéculas musculares, en respuesta a la descarga parasimpática colinérgica (Argiolas y Melis, 1995; Minhas *et al.*, 2001a). En el presente estudio también hemos observado una intensa inmunorreactividad a eNOS en el endotelio que recubre los espacios cavernosos. La densidad de esta inmunorreactividad a eNOS no fue diferente en ambas estirpes de ratones, como tampoco lo fue la magnitud de la respuesta relajante sensible a L-NOARG, sugiriendo que el envejecimiento no va acompañado de una reducción en la relajación nitrérgica endotelial.

Además de NO, en la relajación muscarínica inducida por ACh parece estar también implicado algún prostanoides derivado de la COX ya que parte de dicha relajación es inhibida por indometacina. La producción de diferentes prostanoïdes por el endotelio del cuerpo cavernoso ha sido descrita en diversas especies animales (Minhas *et al.*, 2000a) aunque en cuanto a su papel en la regulación del tono muscular se han arrojado datos muy dispares (Kimura *et al.*, 1990; Azadzoï *et al.*, 1992; Minhas *et al.*, 1998; Minhas *et al.*, 2001a). De entre los prostanoïdes potencialmente implicados, PGE₁ y PGE₂ tienen un efecto relajante sobre este tejido debido a un aumento directo en los niveles de cAMP (Pierce y Regan, 1998; Andersson, 2001a) o actuando por inhibición presináptica de la liberación de NA (Minhas *et al.*, 2000b; Hashitani *et al.*, 2005). También deberían considerarse las ICCs como posible origen de la producción de PGs en respuesta a ACh, ya que expresan COX, a diferencia de los miocitos (Hashitani, 2006) y responden con aumentos de Ca²⁺ intracelular a la estimulación de receptores muscarínicos M₃

(McCloskey, 2010). Hay que tener en cuenta que en nuestro estudio la relajación mediada por prostanoïdes fue dependiente de la producción previa de NO. Así, la indometacina no fue capaz de reducir aún más la relajación en presencia de L-NOARG y el efecto de L-NOARG + indometacina no fue diferente del provocado por L-NOARG sola. Estos resultados sugieren que la activación de COX es secundaria a la producción de NO por parte de eNOS. Apoyando estos resultados la activación de la COX por parte del NO induciendo la liberación de ciertas PGs ha sido observada previamente tanto en células endoteliales como en otros sistemas celulares (Salvemini *et al.*, 1995; Mollace *et al.*, 2005). Además, esta participación de prostanoïdes en la relajación nitrérgica endotelial no parece modificarse con la edad como lo demuestra el hecho de que el efecto de la indometacina fuera similar en ambas estirpes.

El bloqueo de los receptores α -adrenérgicos con fentolamina en preparaciones contraídas con AVP permitió observar una inhibición significativa de la respuesta relajante inducida por ACh, lo que sugiere que parte de esta relajación está relacionada con la activación de dichos receptores. Dado que el efecto postsináptico de la NA sobre el músculo liso trabecular es contráctil, un efecto relajante podría ser debido a una inhibición de la liberación de NA a través de la activación de receptores presinápticos, papel que ha sido previamente atribuido al NO (Yoshida *et al.*, 1998; Saenz de Tejada *et al.*, 2000) y al cGMP (Minhas *et al.*, 2000b). Además, si tenemos en cuenta la existencia de un tono simpático que mantiene el estado de detumescencia peneana, una reducción en la liberación de NA acompañando a la liberación de factores endoteliales relajantes permitiría una relajación más rápida y eficaz del tejido durante la respuesta eréctil. Alternativamente otros autores apuestan por un papel modulador del NO tanto de origen neural (Cellek, 2000) como endotelial (Andersson, 1993) sobre el sistema adrenérgico a nivel postsináptico, reduciendo la respuesta α_1 -adrenérgica sin afectar la liberación del neurotransmisor (Cellek y Moncada, 1997; Wingard *et al.*, 2001), aunque los mecanismos involucrados no están muy claros.

A concentraciones altas (supramicromolares), el efecto directo de la ACh exógena se transformó en contracción, incluso en preparaciones previamente contraídas con NA o AVP. Además, hemos observado como mientras la respuesta relajante endotelial no se modificó en los ratones SAM-P8, el efecto contráctil se vio potenciado de forma muy clara con el envejecimiento. Por lo tanto, los factores involucrados en dicha respuesta contráctil tendrán una repercusión importante en el aumento del tono contráctil y por ende en la impotencia asociada a la edad. En este sentido, la inhibición por atropina ha mostrado claramente como en ambas estirpes la contracción inducida por ACh está mediada por la activación de los receptores muscarínicos endoteliales. Sin embargo, la inhibición de NOS con L-NOARG si bien presentó un efecto potenciador en ratones SAM-R1, posiblemente debido a la eliminación del freno que supone el efecto relajante mediado por NO sobre la contracción, en SAM-P8 la incubación con L-NOARG no sólo

no potenció la contracción sino que redujo su efecto máximo a menos de la mitad. En concordancia con estos resultados, también se observó como L-NOARG sólo inhibió la contracción inducida por ACh que era resistente a fentolamina en ratones SAM-P8, sugiriendo además que este efecto es independiente de la activación de receptores adrenérgicos. Estos resultados paradójicos sugieren que en los animales envejecidos el NO presenta un efecto contráctil. Esta hipótesis obviamente contradice el hecho de que el efecto directo de DEA/NO fue relajante en ambas estirpes, aunque su potencia relajante fuera menor en los animales envejecidos. La inhibición de la respuesta a dosis altas de ACh por L-NOARG podría ser explicada por un mecanismo alternativo relacionado con la producción de radicales libres derivados de NO. Se ha descrito un incremento en los niveles de aniones superóxido con la vejez en las células musculares y endoteliales del cuerpo cavernoso de la rata (Bivalacqua *et al.*, 2003b). La reacción de O_2^- con NO formaría peroxinitrito, el cual podría potenciar a su vez la respuesta contráctil. Se ha descrito en vasos sanguíneos que la mayor producción de peroxinitrito durante el envejecimiento puede inactivar la PGI sintasa del endotelio, desplazando la producción de prostaciclina a otros prostanoides vasoconstrictores, como $PGF_2\alpha$ (Wong y Vanhoutte, 2010; Wong *et al.*, 2009), y un aumento en los niveles de la especies reactivas (isoprostano 8-epi- $PGF_2\alpha$) en la ED arteriogénica (Azadzoi *et al.*, 2005). Alternativamente, el anión superóxido también podría actuar directamente como factor contráctil derivado del endotelio (EDCF) o bien activando la COX en las células musculares lisas o ICCs, produciendo prostanoides que a su vez activarían los receptores TP induciendo la contracción, como parece suceder en la hipertensión (Auch-Schwelk *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 2003). Esta mayor sensibilidad a los prostanoides contráctiles con el envejecimiento también podría derivar de una mayor expresión de las enzimas que los sintetizan o de los receptores prostanoides, como ha sido descrito en la aorta del hámster envejecido, donde prominentes contracciones endotelio-dependientes se acompañan de incrementos en la expresión de COX-1, COX-2, tromboxano sintasa, PGF sintasa y PGD sintasa en las células endoteliales, y de COX-1 y de los receptores EP_4 en las musculares (Tang y Vanhoutte, 2008). En concordancia con esta hipótesis en la ED asociada a la diabetes, la inhibición de la COX con indometacina y el bloqueo de los receptores TP mejoran la relajación endotelial colinérgica del cuerpo cavernoso (Minhas *et al.*, 2001b; Angulo *et al.*, 2006).

Apoyando el papel de los prostanoides en el aumento de contractilidad del cuerpo cavernoso con la edad nuestro estudio muestra como la inhibición de COX elimina las diferencias en la contracción inducida por ACh de ambas estirpes, pudiéndose argumentar que uno de las principales modificaciones en animales envejecidos es una mayor producción de prostanoides contráctiles, asociada a una menor producción y/o biodisponibilidad de NO, colaborando ambos mecanismos a una sensibilización de la respuesta contráctil del cuerpo cavernoso. La participación de un mecanismo similar se ha sugerido en la ED de origen vascular (Azadzoi *et al.*, 1998, 1999). La interacción

funcional entre el NO y las PGs liberadas por el endotelio en el control del tono del músculo liso subyacente ya ha sido puesta de manifiesto previamente en el cuerpo cavernoso del conejo, donde ciertos prostanoides parecen inhibir tanto la liberación tónica como el efecto relajante del NO (Minhas *et al.*, 2001a). Igualmente en otros lechos vasculares humanos se ha mostrado como el NO es capaz de inhibir la síntesis de PGs (Osanai *et al.*, 2000). El hecho de que la inhibición conjunta de NOS y de COX en nuestro estudio origine potenciación de la contracción en SAM-R1 mientras que en SAM-P8 predomine el efecto inhibitorio apoya la hipótesis de que en los animales jóvenes predomina la producción endotelial de NO que limita la contracción inducida por PGs endoteliales. Sin embargo, con el envejecimiento el aumento en la producción de prostanoides contráctiles y la disminución de los niveles de NO se asocian para reducir su capacidad eréctil.

De acuerdo con la hipótesis de que una elevación en los niveles de ROS subyace como uno de los agentes etiológicos más relevantes en la ED asociada al envejecimiento, se ha observado recientemente que el empleo frecuente de inhibidores de PDE en el tratamiento de ED previene la formación de ROS, incrementando la biodisponibilidad de NO y mejorando la vasodilatación en hombres impotentes de edad avanzada (Gur *et al.*, 2008). De hecho, el Sildenafil inhibe la actividad NADPH oxidasa (fuente del anión superóxido) a través de un mecanismo cGMP-PKG dependiente (Koupparis *et al.*, 2005), participando en la recuperación de la función eréctil y reforzando la hipótesis del papel de ROS en el aumento de contractilidad endotelial del cuerpo cavernoso de los ratones SAM-P8.

Por último, la utilización de fentolamina inhibió una gran parte de la contracción a la ACh en el cuerpo cavernoso de ambas estirpes sugiriéndose además la participación de la liberación de NA de los nervios intramurales o la activación directa de sus receptores postsinápticos en esta respuesta. Estudios previos sugieren que diversas PGs vasoconstrictoras como PGD₂ y PGF₂α son capaces de facilitar presinápticamente la liberación de NA (Minhas *et al.*, 2000a; Hashitani *et al.*, 2005).

Podríamos resumir las modificaciones que se producen con el envejecimiento en la funcionalidad endotelial del cuerpo cavernoso de animales SAM-P8 de la siguiente manera:

Resumen de la funcionalidad endotelial del cuerpo cavernoso y de sus modificaciones con el envejecimiento.

- La relajación endotelial inducida por ACh no se encuentra alterada, produciéndose sin embargo hipersensibilidad a la respuesta contráctil inducida por este mediador.

- Tanto la respuesta contráctil como la relajante son dependientes de la activación de receptores muscarínicos y en presencia de atropina se desenmascara una relajación resistente a atropina, de naturaleza desconocida pero que no se modifica en animales envejecidos.
- La respuesta relajante está mediada fundamentalmente por la liberación endotelial de NO a consecuencia de la activación de la eNOS por la activación muscarínica, con una pequeña participación de alguna PG relajante derivada de la activación de la COX por intermedio del propio NO. Además, la inhibición presináptica de la liberación de NA también participaría en la respuesta. Ninguno de estos mecanismos relajantes se modificó en animales envejecidos.
- La respuesta contráctil se debe principalmente a la producción de PGs, existiendo un antagonismo funcional entre el NO y las PGs. En los animales jóvenes la producción de NO parece frenar la acción de PGs contráctiles. Con el envejecimiento una reducción en la producción o biodisponibilidad de NO, junto con la producción de ROS derivados del NO, tales como peroxinitrito, potenciaría la respuesta contráctil prostanoide. En la contracción inducida por ACh también participa la liberación de NA de los nervios adrenérgicos en ambas estirpes.

En conjunto nuestros resultados muestran que el envejecimiento induce un aumento en la contractilidad del cuerpo cavernoso tanto neurogénica como endotelial. El aumento de contractilidad neurogénica es originado por una hiperinervación adrenérgica que podría estar relacionada con una disminución de la sensibilidad del músculo trabecular a la NA. La potenciación de la respuesta contráctil endotelial inducida por la ACh es debida probablemente a una reducción en la liberación o biodisponibilidad de NO que potenciaría la producción de prostanoideos contráctiles. Además aparece un nuevo componente contráctil dependiente de la producción de NO y que podría estar relacionado con un aumento en los niveles de ROS en el tejido. Todo esto se acompaña de una disminución en la sensibilidad del músculo trabecular al NO potenciando el estado de detumescencia del pene y dificultando la erección.

VI. CONCLUSIONES

1. Los animales envejecidos SAM-P8 mostraron síntomas de hiperactividad vesical acompañada de urgencia y aumento en la frecuencia miccional que podría estar directamente relacionada con un aumento en la contractilidad neurogénica en la vejiga de ambos sexos. En las hembras este aumento de contractilidad parece producirse por tres factores: 1) una mayor liberación de ACh durante el impulso nervioso; 2) un incremento en la sensibilidad del músculo al ATP; y 3) la aparición de un componente prostanoide derivado de la ciclooxigenasa. En machos en cambio se debería únicamente a un aumento en la sensibilidad del músculo detrusor al ATP, al tiempo que se reduce la respuesta colinérgica. Además, en los machos, una disminución de la innervación adrenérgica podría disminuir la capacidad vesical y el cierre de la base vesical durante la fase de continencia.

2. En la uretra femenina, el envejecimiento induce un incremento de contractilidad neurogénica. En este caso parece deberse a un aumento en la sensibilidad del músculo a los agentes contráctiles, especialmente la NA, acompañado de una disminución en la capacidad relajante causada fundamentalmente por una denervación nitrérgica. A estos factores neurogénicos se le une una reducción en el número de ICCs de la capa muscular. Estos cambios podrían disminuir el tono miogénico, favoreciendo la aparición de incontinencia, al tiempo que reducirían la capacidad de relajación uretral y por lo tanto el adecuado vaciamiento de la vejiga durante la micción.

3. Tanto en la uretra como en la vejiga de animales SAM-P8 de ambos sexos se detectó un aumento en la densidad de ICCs y/o de nervios colinérgicos y nitrérgicos suburoteliales, sugiriéndose su participación en una hipersensibilización aferente que aumentaría las sensaciones de llenado vesical y alteraría el reflejo de micción.

4. En el cuerpo cavernoso de los machos SAM-P8 se observó un aumento en la contractilidad neurogénica que es debida a una hiperinnervación adrenérgica como mecanismo compensatorio de una disminución en la sensibilidad del músculo trabecular a la NA. A este hecho se le une una disminución en su capacidad de relajación por NO, en parte compensada por un aumento en la innervación nitrérgica. Ambos factores inducirían una reducción de su capacidad eréctil. A diferencia de la uretra, la densidad de ICCs no se vio modificada.

5. El envejecimiento también aumenta la respuesta contráctil mediada por el endotelio del cuerpo cavernoso e inducida por ACh. Este aumento parece ser debido a una reducción en la liberación o biodisponibilidad de NO que potenciaría la producción de prostanoide contráctiles. Además, la producción de ROS derivados del NO, tales como peroxinitrito, potenciaría aún más la respuesta contráctil prostanoide. Todos estos

mecanismos conjuntamente colaborarían en mantener el estado de detumescencia y reducirían la capacidad eréctil del pene.

6. Como mecanismo general el envejecimiento parece producir tanto en el tracto urinario de ambos sexos como en el cuerpo cavernoso, un aumento en la contractilidad del músculo liso en respuesta a factores excitatorios, tanto neurogénicos como endoteliales, que se acompaña en ocasiones de una disminución en su capacidad relajante mediada por NO. Por lo tanto, los agentes terapéuticos que contrarresten estos efectos servirían para mejorar tanto la disfunción eréctil como los trastornos urinarios asociados a la vejez.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abalo R, Vera G, Rivera AJ, Martín MI. (2007). Age-related changes in the gastrointestinal tract: a functional and immunohistochemical study in guinea-pig ileum. *Life Sciences*, 80: 2436-2445
- Adaikan PG, Ratnam SS. (1988). Pharmacology of penile erection in humans. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 11:191-194
- Ahmed H, Moriyama N, Fukasawa R, Nishimatsu H, Tanaka Y, Kitamura T, Tatemichi S, Akiyama K, Suzuki Y, Aisaka K. (2000). Contractile properties of urethral smooth muscles of young and aged female dogs: morphological and pharmacological aspects. *Int J Urol*, 7(8): 298-306
- An JY, Yun HS, Lee YP, Yang SJ, Shim JO, Jeong JH, Shin CY, Kim JH, Kim DS, Sohn UD. (2002). The intracellular pathway of the acetylcholine-induced contraction in cat detrusor muscle cells. *Br J Pharmacol*, 137: 1001-1010
- Andersson KE. (1993). Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev*, 45: 253-308
- Andersson KE. (2000). Neurotransmitters: central and peripheral mechanisms. *Int J Impot Res*, 12 Suppl 4: S26-33
- Andersson KE. (2001a). Pharmacology of penile erection. *Pharmacol rev*, 53:417-450
- Andersson KE. (2001b). Pharmacology of erection function and dysfunction. *Urol Clin North Am*, 28:233-247
- Andersson KE. (2002). Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology*, 59 (5 suppl 1): 43-50
- Andersson KE. (2010). Detrusor myocyte activity and afferent signaling. *Neurourol Urodyn*, 29 (1):97-106
- Andersson KE, Arner A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 84:935-986
- Andersson KE, García-Pascual A, Persson A, Forman A, Tøttrup A. (1992). Electrically-induced nerve-mediated relaxation of rabbit urethra involves nitric oxide. *J Urol*, 147: 253-259
- Andersson KE, Hedlund P. (2002). Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. *Urology*, 60:13-20
- Andersson KE, Larsson B, Sjögren C. (1984). Characterization of the alpha-adrenoceptors in the female rabbit urethra. *Br J Pharmacol*, 81(2):293-300
- Andersson KE, Sjögren C. (1982). Aspects on the physiology and pharmacology of the bladder and urethra. *Prog Neurobiol*, 19:71-89
- Andersson KE, Wagner G. (1995). Physiology of penile erection. *Physiol Rev*, 75:191-236

- Andersson KE, Wein AJ. (2004). Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev*, 56:581-631
- Andersson PO, Malmgren A, Uvelius B. (1990). Functional responses of different muscle types of the female rat urethra in vitro. *Acta Physiol Scand*, 140(3):365-72
- Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Allona A, Moncada I, Martín-Morales A, La Fuente JM, Sáenz de Tejada I. (2006). Enhanced thromboxane receptor-mediated responses and impaired endothelium-dependent relaxation in human corpus cavernosum from diabetic impotent men: role of protein kinase C activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 319 (2):783-789
- Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Gabancho S, Videla S, Saenz de Tejada I. (2003). Calcium dobesilate potentiates endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of human penile resistance arteries. *Br J Pharmacol*, 139:854-862
- Apodaca, G. (2004). The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5:1-12
- Apodaca G, Balestreire E, Birder LA. (2007). The uroepithelial-associated sensory web. *Kidney Int*, 72 (9):1057-64
- Appell RA, England HR, Hussell AR y McGuire EJ. (1980). The effects of epidural anesthesia on the urethral closure pressure profile in patients with prostatic enlargement. *J Urol*, 124:410-411
- Argiolas A, Melis MR. (1995). Neuromodulation of penile erection: an overview of the role of neurotransmitters and neuropeptides. *Progress in Neurobiology*, 47: 235-255
- Arrighi N, Bodei S, Peroni A, Mirabella G, Zani D, Simeone C, Cunico SC, Spano P, Sigala S. (2008). Detection of muscarinic receptor subtypes in human urinary bladder mucosa: age and gender-dependent modifications. *Neurourol Urodyn*, 27:421-428
- Artim DE, Kullmann FA, Daugherty SL, Wu HY, de Groat WC. (2009). Activation of the nitric oxide-cGMP pathway reduces phasic contractions in neonatal rat bladder strips via protein kinase G. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297(2):F333-40
- Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. (1989). Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 13:859-64
- Augsburger HR, Cruz-Orive LM, Arnold S. (1993). Morphology and Steorology of the Female Canine Urethra Correlated with the Urethral Pressure Profile. *Acta Anat*, 148:197-205
- Ayta IA, McKinlay JB, Krane RJ. (1999). The likely world-wide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int*, 84:50-6
- Azadzoi KM, Goldstein I, Siroky M, Traish A, Krane R, Saenz de Tejada I. (1998). Mechanisms of ischaemia induced cavernosal smooth muscle relaxation impairment in a rabbit model of vasculogenic erectile dysfunction. *J Urol*, 160:2216-2222

- Azadzi KM, Kim N, Brown M, Goldstein I, Cohen R, Saenz de Tejada I. (1992). Endothelium derived nitric oxide and cyclo-oxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J Urol*, 147:220-225
- Azadzi KM, Krane R, Saenz de Tejada I, Goldstein I, Siroky M. (1999). Relative roles of cyclooxygenase and nitric oxide synthase pathways in ischaemia induced increased contraction of cavernosal smooth muscle. *J Urol*, 161:1324-1328
- Azadzi KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. (2005). Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J Urol*, 174(1):386-93
- Azadzi KM, Shinde VM, Tarcan T, Kozlowski R, Siroky MB. (2003). Increased leukotriene and prostaglandin release and overactivity in the chronically ischemic bladder. *J Urol*, 169:1885–1891
- Baker DM, Watson SP, Santer RM. (1991). Evidence for a decrease in sympathetic control of intestinal function in the aged rat. *Neurobiol Aging*, 12:363-365
- Bakircioglu ME, Sievert KD, Nunes L, Lau A, Lin CS, Lue TF. (2001). Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1 expression in the penile tissue of aged rats. *J Urol*, 166:734-8
- Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A. (1998). Shear stress and the endothelium. *Kidney Int*, 67 (suppl):S100-S108
- Barrick SR, Lee H, Meyers S, Caterina MJ, Kanai AJ, Zeidel ML, Chopra B, de Groat WC, Birder L. (2004). Expression and function of TRPV4 in urinary bladder urothelium. *Soc Neurosci Abstr*, 26:708
- Barrington F. (1915). The nervous mechanism of micturition. *Q J Exp Physiol*, 8:653-65
- Bayliss M, Wu C, Newgreen D, Mundy AR, Fry CH. (1999). A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladders. *J Urol*, 162:1833-1839
- Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Scheller F, Knapp W, Hartman U, Jonas U. (2002). Cavernous and systemic plasma levels of norepinephrine and epinephrine during different penile conditions in healthy men and patients with erectile dysfunction. *Urology*, 59:281-286
- Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Hartman U, Sohn M, Jonas U. (2000). Systemic and cavernous plasma levels of endothelin 1 in healthy males during different functional conditions of the penis. *World J Urol*, 18:227-231
- Beckett EA, Horiguchi K, Khoyi M, Sanders KM, Ward SM. (2002). Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/Sld mice. *J Physiol*, 543:871-887
- Berridge MJ. (2008). Smooth muscle cell calcium activation mechanism. *J Physiol*, 536(21):5047-5061
- Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro L, Cirino G. (2007). Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *PNAS*, 106(11): 4513-4518

- Biers SM, Reynard JM, Doore T, Brading AF. (2006). The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor. *BJU Int*, 97(3):612-6
- Birder LA. (2006). Urinary bladder urothelium: Molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascul Pharmacol*, 45:221-226
- Birder LA. (2010). Urothelial signalling. *Auton Neurosci*, 153(1-2):33-40
- Birder LA, Barrick SR, Roppolo JR, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Buffington CA. (2003). Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285:F423–F429
- Birder LA, de Groat WC. (2007). Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in the bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol*, 4(1):46-54
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ. (2001). Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *PNAS*, 98:13396–13401
- Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick SR, Kanai AJ, Wang E, Ruiz WG, de Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ. (2002a). Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci*, 5:856–860
- Birder LA, Nealen ML, Kiss S, de Groat WC, Caterina MJ, Wang E, Apodaca G, Kanai AJ. (2002b). Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci*, 22(18):8063-70
- Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick SR, Buffington CA, Roppolo JR, Ford AP, de Groat WC, Burnstock G. (2004). Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol*, 287:F1084–F1091
- Bivalacqua TJ, Armstrong JS, Biggerstaff J, Abdel-Mageed AB, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ, Champion HC. (2003b). Gene transfer of extracellular SOD to the penis reduces O₂^{•-} and improves erectile function in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284:H1408-1421
- Bivalacqua TJ, Burnett A, Hellstrom WJ, Champion HC. (2007). Overexpression of arginase in the aged mouse penis impairs erectile function and decreases eNOS activity: influence of in vivo gene therapy of anti-arginase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292:H1340-H1351
- Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. (2000). Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Trends Pharmacol Sci*, 21:484-489
- Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Celtek S, Chitale K, Webb RC, Lewis RL, Mills TM, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. (2004). RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci*, 101:9121-9126

- Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. (2003a). Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J Androl*, 24(6 suppl): S17-37
- Bonev AD, Nelson MT. (1993). Muscarinic inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels by protein kinase C in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol*, 265:C1723-C1728
- Bonnevier J, Arner A. (2004). Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2+) sensitization in smooth muscle. *Biol Chem*, 279:28998–29003
- Borda E, Contreras-Ortiz N, Gutnisky R, Gimeno MF. (1982). In vitro effect of acetylcholine and bethanechol on the contractions of the human detrusor muscle. Influence of prostaglandins. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 259(1):31-9
- Boyle P, Robertson C, Mazzeta C, Keech M, Hobbs R, Fourcade R, Kiemeny L, Lee C; UrEpik Study Group. (2003). The association between lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction in four centres: the UrEpik study. *BJU Int*, 92:719-25
- Bozkurt NB, Vural IM, Sarioglu Y, Pekiner C. (2007). Nicotine potentiates the nitrgic relaxation responses of rabbit corpus cavernosum tissue via nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, 558:172-178
- Brading AF. (1997). A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology*, 50(6A Suppl):57-67; discussion 68-73
- Brading AF. (1999). The physiology of the mammalian urinary outflow tract. *Exp Physiol*, 84: 215-221
- Brading AF, McCloskey KD. (2005). Mechanism of disease: specialized interstitial cells of the urinary tract- an assessment of current knowledge. *Nat Clin Pract Urol*, 2:546-554
- Bradley E, Hollywood MA, Johnston L, Large RJ, Matsuda T, Baba A, McHale NG, Thornbury KD y Sergeant GP. (2006). Contribution of reverse Na⁺-Ca²⁺ exchange to spontaneous activity in interstitial cells of Cajal in the rabbit urethra. *J Physiol*, 574(3): 651-661
- Braverman AS, Kohn IJ, Luthin GR, Ruggieri MR. (1998b). Prejunctional M₁ facilitatory and M₂ inhibitory muscarinic receptors mediate rat bladder contractility. *Am J Physiol*, 274(2 Part 2):R517–R523
- Braverman AS, Legos JJ, Young W, Luthin G, Ruggieri MR. (1999). M₂ receptors in genito-urinary smooth muscle pathology. *Life Sci*, 64:429–436
- Braverman AS, Luthin GR, Ruggieri MR. (1998a). M₂ muscarinic receptor contributes to contraction of the denervated rat urinary bladder. *Am J Physiol*, 275:R1654–R1660
- Braverman AS, Ruggieri MR. (2003). Hypertrophy changes the muscarinic receptor subtype mediating bladder contraction from M₃ toward M₂. *Am J Physiol*, 285:R701–R708

- Braverman AS, Tallarida RJ, Ruggieri MR. (2002). Interaction between muscarinic receptor subtype signal transduction pathways mediating bladder contraction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283(3):R663-8
- Braverman AS, Tibb AS, Ruggieri MR. (2006). M₂ and M₃ muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. I. Normal rat bladder. *J Pharmacol Exp Ther*, 316(2):869-74
- Breza J, Aboseif SR, Orvis BR, Lue TF, Tanagho EA. (1989). Detailed anatomy of penile neurovascular structures: surgical significance. *J Urol*, 141:437-443
- Brown WW, Zenser TV, Davis BB. (1980). Prostaglandin E₂ production by rabbit urinary bladder. *Am J Physiol*, 239:F452-F458
- Bultitude MI, Hills NH, Shuttleworth KE. (1976). Clinical and experimental studies on the action of prostaglandins and their synthesis inhibitors on detrusor muscle in vitro and in vivo. *Br J Urol*, 48(7):631-7
- Burcher E, Zeng XP, Strigas J, Shang F, Millard RJ, Moore KH. (2000). Autoradiographic localization of tachykinin and calcitonin gene-related peptide receptors in adult urinary bladder. *J Urol*, 163:331-337
- Burnett AL. (2004). Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J Impot Res*, 16 (suppl 1): S15-9
- Burnett AL, Lowenstein CJ, Breidt, DS, Chang TSK, Sydner SH. (1992). Nitric oxide: A physiological mediator of penile erection. *Science*, 257:401-403
- Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, Epstein JI, Lowenstein CJ, Breidt DS, Snyder SH, Walsh PC. (1993). Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol*, 150:73
- Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM. (1996). Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci, USA* 93:12008-12013
- Burnstock G. (2001). Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci*, 22:182-188
- Burnstock G. (2006). Purinergic signaling. *Br J Pharmacol*, 147(Suppl 1):S172-S181
- Burnstock G. (2009). Purinergic signaling: past, present and futur. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42:3-8
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*, 23:374-380
- Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley Jr SC. (2003). Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase ½ cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol*, 63:325-31

- Calabrò A, Italiano G, Pescatori ES, Marin A, Gaetano O, Abatangelo G, Pagano F. (1996). Physiological aging and penile erectile function: A study in the rat. *Eur Urol*, 29:240-4
- Callahan SM, Creed KE. (1981). Electrical and mechanical activity of the isolated lower urinary tract of the guinea-pig. *Br J Pharmacol*, 74(2):353-8
- Canda AE, Cinar MG, Turna B, Sahin MO. (2008). Pharmacologic targets on the female urethra. *Urol Int*, 80(4):341-54
- Canon E, Timmermans LG, Reznik M, Timmermans LM. (1990). Ultrastructural modifications of the bladder wall in senescence. *Acta Urol Belg*, 58(4):29-40
- Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR. (2005). Mutations in the pore region modify epithelial sodium channel gating by shear stress. *J Cell Biol*, 280:4393-4401
- Carlile A, Davies I, Rigby A, Brocklehurst JC. (1988). Age changes in the human female urethra: a morphometric study. *J Urol*, 139(3):532-5
- Carrier S, Nagaraju P, Morgan D, Baba K, Nunes L, Lue T. (1997). Age decreases nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis. *J Urol*, 157:1088-1092
- Carrier S, Zvara P, Nunes L, Kour NW, Rehman J, Lue TF. (1995). Regeneration of nitric oxide synthase-containing nerves after cavernous nerve neurotomy in the rat. *J Urol*, 153:1722
- Cellek S. (2000). Nitroergic-noradrenergic interaction in penile erection: a new insight into erectile dysfunction. *Drugs today*, 36(2-3):135-46
- Cellek S, Moncada S. (1997). Nitroergic control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: A comparison with other species. *Proc Natl Acad Sci*, 94:8226-8231
- Chai TC, Andersson KE, Tuttle JB, Steers WD. (2000). Altered neural control of micturition in the aged F344 rat. *Urol Res*, 28(5):348-54
- Chai TC, Steers WD. (1996). Neurophysiology of micturition and continence. *Urol Clin North Am*, 23(2):221-36
- Chancellor MB, de Groat WC. (1999). Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways to treat the overactive bladder. *J Urol*, 162:3-11
- Chang S, Hypolite JA, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, DiSanto ME. (2003). Increased contractility of diabetic rabbit corpora smooth muscle in response to endothelin is mediated via Rho-kinase beta. *Int J Impot Res*, 15(1):53-62
- Chicharro RV, Parrilla RB. (2010). Recuerdo y actualización de las bases anatómicas del pene. *Arch Esp Urol*, 63(8):575-80
- Cho HJ, Xie Q, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med*, 176: 599-604

- Choppin A. (2002). Muscarinic receptors in isolated urinary bladder smooth muscle from different mouse strains. *Br J Pharmacol*, 137:522-528
- Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel J, Zeidel ML, Ford AP, deGroat WC, Birder LA. (2005). Expression and function of bradykinin B1/B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol*, 562:859–871
- Christ GJ, Day NS, Day M, Zhao W, Persson K, Pandita RK, Andersson KE. (2003). Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284(5):R1241-8
- Christ GJ, Hodges S. (2006). Molecular mechanisms of detrusor and corporal myocyte contraction: identifying targets for pharmacotherapy of bladder and erectile dysfunction. *Br J Pharmacol*, 147 suppl 2:S41-55
- Christ GJ, Maayani S, Valcic M, Melman A. (1990). Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in alpha-adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. *Br J Pharmacol*, 101:375-381
- Christ GJ, Moreno AP, Parker ME, Gondre CM, Valcic M, Melman A, Spray DC. (1991a). Intercellular communication through gap junctions: a potential role in pharmacomechanical coupling and syncytial tissue contraction in vascular smooth muscle isolated from the human corpus cavernosum. *Life Sci*, 49(24):PL195-200
- Christ GJ, Stone B, Melman A. (1991b). Age-dependent alterations in the efficacy of phenylephrine-induced contractions in vascular smooth muscle isolated from the corpus cavernosum of impotent men. *Can J Physiol Pharmacol*, 69:909-913
- Chua WC, Liu L, Mansfield KJ, Vaux KJ, Moore KH, Millard RJ, Burcher E. (2007). Age-related changes of P2X(1) receptor mRNA in the bladder detrusor from men with and without bladder outlet obstruction. *Exp Gerontol*, 42(7):686-92
- Chuang Y, Fraser MO, Yu Y, Chancellor MB, De Groat WC, Yoshimura N. (2001). The role of bladder afferent pathways in the bladder hyperactivity induced by intravesical administration of nerve growth factor. *J Urol*, 165:975–979
- Chun AL, Wallace LJ, Gerald MC, Wein AJ, Levin RM. (1989). Effects of age on urinary bladder function in the male rat. *J Urol*, 141:170-173
- Clobes A, DeLancey JO, Morgan DM. (2008). Urethral circular smooth muscle in young and old women. *Am J Obstet Gynecol*, 198(5):587.e1-5
- Collas DM, Malone-Lee JG. (1996). Age-associated changes in detrusor sensory function in women with lower urinary tract symptoms. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 7(1):24-9

- Collins C, Klausner AP, Herrick B, Koo HP, Miner AS, Henderson SC, Ratz PH. (2009). Potential for control of detrusor smooth muscle spontaneous rhythmic contraction by cyclooxygenase products released by interstitial cells of Cajal. *J Cell Mol Med*, 13(9B):3236-50
- Costa C, Vendeira MD. (2008). Does erectile tissue angioarchitecture modify with aging? An immunohistological and morphometric approach. *J Sex Med*, 5:833-840
- Coyne KS, Sexton CC, Thompson CL, Milsom I, Irwin D, Kopp ZS, Chapple CR, Kaplan S, Tubaro A, Aiyer LP, Wein AJ. (2009). The prevalence of lower urinary tract symptoms (LUTS) in the USA, the UK and Sweden: results from the Epidemiology of LUTS (EpiLUTS) study. *BJU Int*, 104(3):352-60
- Creed KE, Loxley RA, Phillipd JK. (2010). Functional expression of muscarinic and purinoceptors in the urinary bladder of male and female rats and guinea pigs. *J Smooth Muscle Res*, 46(4):201-215
- Dahiya R, Lin A, Bakircioglu ME, Huang ST, Lue TF. (1997). mRNA and protein expression of nitric oxide synthase and adrenoceptor alpha 1 in young and old rat penile tissues. *Br J Urol*, 80:300-306
- Dai Y, Pollock DM, Lewis RL, Wingard CJ, Stopper VS, Mills TM. (2000). Receptor-specific influence of endothelin-1 in the erectile response of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279:R25-R30
- Dail WG. (1993). Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In the autonomic nervous system, nervous control of the urogenital system. (Maggi CA ed) 6:69-101
- Dambros M, van Koeveringe GA, Bast A, van Kerrebroeck PEV. (2004). Relaxant effects of estradiol through non-genomic pathways in male and female pig bladder smooth muscle. *Pharmacology*. 72:121-127
- D'Andrea MR, Saban MR, Nguyen NB, Andrade-Gordon P, Saban R. (2003). Expression of protease-activated receptor -1, -2, -3 and -5 in control and experimentally inflamed mouse bladder. *Am J Pathol*, 162:907-923
- Davis B, Chapple C, Chess-Williams R. (1999). The α_{1L} -adrenoceptor mediates contraction in human erectile tissue. *Eur Urol*, 35 (suppl 2):102
- de Groat WC. (1993). Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Urol Clin North Am*, 20(3):383-401
- de Groat WC. (1998). Anatomy of the central neural pathways controlling the lower urinary tract. *Eur Urol*, 1(suppl 1):2-5
- de Groat WC. (2006). Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol*, 147:S25-S40
- de Groat WC, Booth AM. (1993). Synaptic Transmission In Pelvic Ganglia. In: The Autonomic Nervous System Vol. 3, Nervous Control of the Urogenital System, ed.
- de Groat WC, Theobald RJ. (1976). Reflex activation of sympathetic pathways to vesical smooth muscle and parasympathetic ganglia by electrical stimulation of vesical afferents. *J Physiol*, 259(1):223-37

- de Jongh R, van Koevinge GA, van Kerrebroeck PE, Markerink-van Ittersum M, de Vente J, Gillespie JJ. (2007a). The effects of exogenous prostaglandins and the identification of constitutive cyclooxygenase I and II immunoreactivity in the normal guinea pig bladder. *BJU Int*, 100(2):419-29
- de Jongh R, van Koevinge GA, van Kerrebroeck PE, Markerink-van Ittersum M, de Vente J, Gillespie JJ. (2007b). Alterations to network of NO/cGMP-responsive interstitial cells induced by outlet obstruction in guinea-pig bladder. *Cell Tissue Res*, 330(1):147-60
- Delanty N, Reilly M, Pratico D, Fitzgerald DJ, Lawson JA, Fitzgerald GA. (1996). 8-Epi PGF2 alpha: specific analysis of an isoeicosanoid as an index of oxidant stress in vivo. *Br J Clin Pharmacol*, 42:15-19
- Deplanne V, Palea S, Angel I. (1998). The adrenergic, cholinergic and NANC nerve-mediated contractions of the female rabbit bladder neck and proximal, medial and distal urethra. *Br J Pharmacol*, 123:1517-1524
- Desai KM, Zembowicz A, Sessa WC, Vane JR. (1991). Nitroergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24):11490-4
- Dickson A, Avelino A, Cruz F, Ribeiro-da-Silva A. (2006). Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience*, 141(3):1633-47
- Diederich D, Yang Z, Buhler F, Luscher T. (1990). Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 258(27):H445-H451
- Dixon JS, Gilpin SA, Gilpin CJ, Gosling JA. (1983). Intramural ganglia of the urinary bladder. *Br J Urol*, 55:195-198
- Dixon JS, Jen PYP, Gosling JA. (2000). The distribution of vesicular acetylcholine transporter in the human male genitourinary organs and its co-localization with neuropeptide Y and nitric oxide synthase. *Neurourol Urodyn*, 19:185-194
- Dmitrieva N, Zhang G, Nagabukuro H. (2008). Increased α_{1D} -adrenergic receptor activity and protein expression in the urinary bladder of aged rats. *World J Urol*, 26(6): 649-55
- Eaton AC, Bates CP. (1982). An in vitro physiological study of normal and unstable detrusor. *Br J Urol*, 54:653-657
- Ek A, Alm P, Andersson KE, Persson CG. (1977). Adrenoceptor and cholinergic mediated responses of the isolated human urethra. *Scand J Urol Nephrol*, 11(2):97-102
- Elbadawi A, Diokno AC, Millard RJ. (1998). The aging bladder: Morphology and urodynamics. *World J Urol*, 16 (suppl 1):S10-S34
- Elneil S, Skepper JN, Kidd EJ, Williamson JG, Ferguson DR. (2001). Distribution of P2X(1) and P2X(3) receptors in the rat and human urinary bladder. *Pharmacology*, 63(2):120-8

- El-Sakka AI, Lue TF. (2004). Physiology of penile erection. *ScientificWorld Journal*, 4 (suppl 1):128-34
- Erspamer GF, Negri L, Piccinelli D. (1973). The use of preparations of urinary bladder smooth muscle for bioassay of and discrimination between polypeptides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 279:61-74
- Escrig A, Marin R, Mas M. (1999). Repeated PGE1 treatment enhances nitric oxide and erection responses to nerve stimulation in the rat penis by upregulating constitutive NOS isoforms. *J Urol*, 162:2205-2210
- Exintaris B, Klemm MF, Lang R. (2002). Spontaneous slow wave and contractile activity of the guinea pig prostate. *J Urol*, 168:315-322
- Fall M, Lindstrom S, Mazieres L. (1990). A bladder-to-bladder cooling reflex in the cat. *J Physiol*, 427:281-300
- Faria M, Magalhaes-Cardoso T, Lafuente-de-Carvalho JM, Correia-de-Sa P. (2006). Corpus cavernosum from men with vasculogenic impotence is partially resistant to adenosine relaxation due to endothelial A(2B) receptor dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, 319:405-13
- Fedirchuk B, Shefchyk SJ. (1993). Membrane potential changes in sphincter motoneurons during micturition in the decerebrate cat. *J Neurosci*, 13(7):3090-4
- Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, Kleinman KP, Mohr BA, Araujo AB, McKinlay JB. (2000). Erectile dysfunction and coronary risk factors: Prospective results from the Massachusetts Male Aging Study. *Prev Med*, 30:328-38
- Fenton M, Huang HL, Hong Y, Hawe E, Hurz DJ, Erusalimsky JD. (2004). Early atherogenesis in senescence-accelerated mice. *Exp Gerontol*, 39:115-122
- Ferrer JE, Velez JD, Herrera AM. (2010). Age-related morphological changes in smooth muscle and collagen content in human corpus cavernosum. *J Sex Med*, 7(8): 2723-8
- Ferrini M, Magee TR, Vernet D, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. (2001). Aging-related expression of inducible nitric oxide synthase and markers of tissue damage in the rat penis. *Biol Reprod*, 64:974-982
- Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Escames G, Tresguerres J.A.F. (2011). Effect of a combined treatment with growth hormone and melatonin in the cardiological aging on male SAMP8 mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 66 (8):823-34
- Forrest AS, Ordog T, Sanders KM. (2006). Neural regulation of slow-wave frequency in the murine gastric antrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290:G486-G495
- Fovaeus M, Andersson KE y Hedlund H. (1987). Effects of some calcium channel blockers on isolated human penile erectile tissues. *J Urol*, 138:1267-1272
- Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. (2008). The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*, 9:453-466

- Frankel SJ, Donovan JL, Peters TI, Abrams P, Dabhoiwala NF, Osawa D, Lin AT. (1998). Sexual function in men with lower urinary tract symptoms. *J Clin Epidemiol*, 51: 677-85
- Frazier EP, Braverman AS, Peters SL, Michel MC, Ruggieri MR. (2007). Does phospholipase C mediate muscarinic receptor-induced rat urinary bladder contraction? *J Pharmacol Exp Ther*, 322 (3):998-1002
- Frazier EP, Peters SL, Braverman AS, Ruggieri MR, Michel MC. (2008). Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and beta-adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 377(4-6): 449-62
- Frazier EP, Schneider T, Michel MC. (2006). Effects of gender, age and hypertension on β -adrenergic receptor function in rat urinary bladder. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 373:300-309
- Fry CH, Bayliss M, Young JS, Hussain M. (2011). Influence of age and bladder dysfunction on the contractile properties of isolated human detrusor smooth muscle. *BJU Int*, 108:2 pt 2: E91-6
- Fry CH, Meng E, Young JS. (2010). The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. *Auton Neurosci*, 154:3-13
- Fry CH, Sui GP, Kanai AJ, Wu C. (2007). The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder. *NeuroUrol Urodyn*, 26 (suppl 6):914-9
- Fry CH, Sui GP, Severs NJ, Wu C. (2004). Spontaneous activity and electrical coupling in human detrusor smooth muscle: implications for detrusor overactivity? *Urology*, 63(3 suppl 1):3-10
- Furuya S, Kumamoto Y, Yokoyama E, Tsukamoto T, Izumi T y Abiko Y. (1982). α -Adrenergic activity and urethral pressure in prostatic zone in benign prostatic hypertrophy. *J Urol*, 128:836-839
- Gabella G. (1997). Cells and cell junctions in the muscle coat of the bladder. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 184:3-6
- Gabella G, Davis C. (1998). Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol*, 27:141-155
- Garban H, Marquez D, Cai L, Rajfer J, González-Cadavid NF. (1995). Restoration of normal adult penile erectile response in aged rats by long-term treatment with androgens. *Biol Reprod*, 53:1365-1372
- García-Pascual A, Costa G, García-Sacristán A, Andersson KE. (1991a). Calcium-dependence of contractile activation of isolated sheep urethra. I: Responses to electrical stimulation. *Pharmacol Toxicol*, 69(4):263-9
- García-Pascual A, Costa G, García-Sacristán A, Andersson KE. (1991b). Relaxation of sheep urethral muscle induced by electrical stimulation of nerves: involvement of nitric oxide. *Acta Physiol Scand*, 141:531-539
- García-Pascual A, Costa G, Labadía A, Jiménez E, Triguero D, Rodríguez-Veiga E, González-Soriano J. (2005). Partial nicotinic receptor blockade unmasks a modulatory role of nitric oxide on urethral striated neuromuscular transmission. *Nitric Oxide*, 13:98-110

- García-Pascual A, Labadía A, García-Flores M, Sancho M, Triguero D. (2010). Refractoriness of urethral striated muscle contractility to nitric oxide-dependent cyclic GMP production. *Nitric Oxide*, 23(1):26-33
- García-Pascual A, Larsson B, Andersson KE. (1990). Contractile effects of endothelin-1 and localization of endothelin binding sites in rabbit lower urinary tract smooth muscle. *Acta Physiol Scand*, 140:545–555
- García-Pascual A, Persson K, Holmquist F, Andersson KE. (1993). Endothelin-1-induced phosphoinositide hydrolysis and contraction in isolated rabbit detrusor and urethral smooth muscle. *Gen Pharmacol*, 24:131–138
- García-Pascual A, Sancho M, Costa G, Triguero D. Interstitial cells of Cajal in the urethra are GMP-mediated targets of nitrergic neurotransmission. (2008). *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(4):F971-83
- García-Pascual A, Triguero D. (1994). Relaxation mechanism induced by stimulation of nerves and by nitric oxide in sheep urethral muscle. *J Physiol*, 476:333-347
- Gartner LP, Hiatt JL. (2002). Sistema urinario. En: *Texto-Atlas de Histología*. 2ª Edición. Mc Graw-Hill Interamericana S.A. México DF. Pág 415-438
- Giglio D, Tobin G. (2009). Muscarinic receptor subtypes in the lower urinary tract. *Pharmacology*, 83:259-269
- Gillespie JI, Markerink-van Ittersum M, de Vente J. (2004). cGMP generating cells in the bladder wall: identification of distinct networks of interstitial cells. *BJU Int*, 94:1114-1124
- Gillespie JI, Markerink-van Ittersum M, de Vente J. (2005). Expresión of neural nitric oxide synthase (nNOS) and nitric-oxide-induced changes in cGMP in the urothelial layer of the guinea pig bladder. *Cell Tissue Res*, 321:341-351
- Gillespie JI, Markerink-van Ittersum M, de Vente J. (2006). Endogenous NO/cGMP signalling in the guinea pig bladder: evidence for distinct populations of sub-urothelial interstitial cells. *Cell Tissue Res*, 325:325-33
- Gilmore NJ, Vane JR. (1971). Hormones released into the circulation when the urinary bladder of the anaesthetized dog is distended. *Clin Sci*, 41:69-83
- Gilpin SA, Gilpin CJ, Dixon JS, Gosling JA, Kirby RS. (1986). The effect of age on the autonomic innervation of the urinary bladder. *Br J Urol*, 58(4):378-81
- Gingell C. (1998). Use of intracavernosal Alprostadil in erectile dysfunction. *Hosp Med*, 59:777
- Giuliano F, Bernabe J, Jardin A, Rousseau JP. (1993). Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. *J Urol*, 150(2 Pt 1):519-24
- Gleason DM, Bottaccini MR, Drach GW. (1976). Urodynamics. *J Urol*, 115(4):356-61

- Goepel M, Kregge S, Price DT, Michelotti GA, Schwinn DA, Michel MC. (1999). Characterization of alpha-adrenoceptor subtypes in the corpus cavernosum of patients undergoing sex change surgery. *J Urol*, 162:1793-1799
- Gómez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Sarr MG, Kendrick ML, Shen R, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T, Pozo MJ, Farrugia G. (2011). Changes in interstitial cells of cajal with age in the human stomach and colon. *Neurogastroenterol Motil*, 23:36-44
- González-Soriano J, Martín-Palacios S, Rodríguez-Veiga E, Triguero D, Costa G, García-Pascual A. (2003). Nitric oxide synthase in the external urethral sphincter of the sheep: immunohistochemical and functional study. *J Urol*, 169(5): 1901-6
- Gosling JA. (1997). Modification of bladder structure in response to outflow obstruction and ageing. *Eur Urol*, 32(suppl 1):9-14
- Gosling JA, Dixon JS, Jen PYP. (1999). The distribution of noradrenergic nerves in the human lower urinary tract. *Eur Urol*, 38(suppl 1):23-30
- Goto K, Matsuoka S, Noma A. (2004). Two types of spontaneous depolarizations in the intestinal cells freshly prepared from the murine small intestine. *J Physiol*, 559: 411-422
- Gratzke C, Angulo J, Chitaley K, Dai Y, Kim N, Paick JS, Simonsen U, Uckert S, Wespes E, Andersson KE, Lue T, Stief C. (2010). Anatomy, physiology and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med*, 7:445-475
- Griffiths DJ, Tadic SD, Schaefer W, Resnick NM. (2009). Cerebral control of the lower urinary tract: how age-related changes might predispose to urge incontinence. *NeuroImage*, 47: 981–986
- Grol S, van Koevinge GA, de Vente J, van Kerrebroeck PE, Gillespie JJ. (2008). Regional differences in sensory innervation and suburothelial interstitial cells in the bladder neck and urethra. *BJU Int*, 102(7): 870-7
- Gur S, Hellstrom WJG. (2009). Activation of P2Y1 and P2Y2 nucleotide receptors by adenosine 5'-triphosphate analogues augmented nerve-mediated relaxation of human corpus cavernosum. *Can Urol Assoc J*, 3(4):314-418
- Gur S, Ozturk B. (2000). Altered relaxant responses to adenosine and adenosine 5'-triphosphate in the corpus cavernosum from men and rats with diabetes. *Pharmacology*, 60:105-12
- Gur S, Sikka SC, Hellstrom WJG. (2008). Novel phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors in the alleviation of erectile dysfunction due to diabetes and ageing-induced oxidative stress. *Expert Opin Investig Drugs*, 17(6):855-864
- Haas C, Seftel A, Razmjouei K, Ganz M, Hampel N, Ferguson K. (1998). Erectile dysfunction in aging: upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Urology*, 51:516-522
- Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M. (1990). Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol*, 425:545-562

- Haefliger JA, Tissières P, Tawadros T, Formenton A, Bény JL, Nicod P, Frey P, Meda P. (2002). Connexins 43 and 26 are differentially increased after rat bladder outlet obstruction. *Exp Cell Res*, 274(2):216-25
- Haferkamp A, Mundhenk J, Bastian PJ, Reitz A, Dörsam J, Pannek J, Schumacher S, Schurch B, Büttner R, Müller SC. (2004). Increased expression of connexin 43 in the overactive neurogenic detrusor. *Eur Urol*, 46(6):799-805
- Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak A. (2001). Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*, 37:529-534
- Hampel C, Wienhold D, Benken N, Eggersmann C, Thuroff JW. (1997). Definition of overactive bladder and epidemiology of urinary incontinence. *Urology*, 50 (6A suppl.): 4-14
- Hardy LA, Harvey IJ, Chambers P, Gillespie JL. (2000). A putative alternatively spliced variant of the P2 X(1) purinoreceptor in human bladder. *Exp Physiol*, 85:461-463
- Harhun MI, Gordienko DV, Povstyan OV, Moss RF, Bolton TB. (2004). Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circ Res*, 95:619-626
- Harrison SC, Hunnam GR, Farman P, Ferguson DR, Doyle PT. (1987). Bladder instability and denervation in patients with bladder outflow obstruction. *Br J Urol*, 60(6):519-22
- Harriss DR, Marsh KA, Birmingham AT, Hill SJ. (1995). Expression of muscarinic M3-receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis in human detrusor cultured smooth muscle cells. *J Urol*, 154:1241-1245
- Harvey RA, Skennerton DE, Newgreen D, Fry CH. (2002). The contractile potency of adenosine triphosphate and ecto-adenosine triphosphatase activity in guinea pig detrusor and detrusor from patients with a stable, unstable or obstructed bladder. *J Urol*, 168(3): 1235-9
- Hashitani H. (2006). Interaction between interstitial cells and smooth muscles in the lower urinary tract and penis. *J Physiol*, 576 (3):707-714
- Hashitani H, Suzuki H. (2004). Identification of interstitial cells of Cajal in corporal tissues of the guinea-pig penis. *Br J Urol*, 141:199-204
- Hashitani H, Yanai Y, Shirasawa N, Soji T, Tomita A, Kohri K, Suzuki H. (2005). Interaction between spontaneous and neurally mediated regulation of smooth muscle tone in the rabbit corpus cavernosum. *J Physiol*, 569 (3):723-735
- Hashitani H, Yanai Y, Suzuki H. (2004). Role of interstitial cells and gap junctions in the transmission of spontaneous Ca^{2+} signals in detrusor smooth muscles of the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*, 559:567-581
- Hayes EE, McConnell JA, Benson GS. (1983). The effect of aging on cholinergic receptor binding in the rat urinary bladder. *Neurourol Urodyn*, 2:311

- Hedge SS, Chopin A, Bonhaus D, Briaud S, Loeb M, Moy TM, Loury D, Eglen RM. (1997). Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 120:1409-1418
- Hedlund P, Alm P, Ekstrom P, Fahrenkrug J, Hannibal J, Hedlund H, Larsson B, Andersson KE. (1995). Pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*, 116:2258-2266
- Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson KE. (2000). Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol*, 164: 868-875
- Heppner TJ, Werner ME, Nausch B, Vial C, Evans RJ, Nelson MT. (2009). Nerve-evoked purinergic signalling suppresses action potentials, Ca^{2+} flashes and contractility evoked by muscarinic receptor activation in mouse urinary bladder smooth muscle. *J Physiol*, 587(21):5275-5288
- Hirata H, Kawamoto K, Kikuno N, Kawakami T, Kawakami K, Saini S, Yamamura S, Dahiya R. (2009). Restoring erectile function by antioxidant therapy in diabetics rats. *J Urol*, 182(5):2518-25
- Hirst GDS, Edwards FR. (2004). Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci*, 96:1-10
- Hodges GM. (1978). In: *Scanning Electron Microscopy* (Edited by A.M.F. O'Hare). Vol.II, P. 983. SEM Inc., II 60666, USA
- Holm NR, Horn T, Hald T. (1995). Detrusor in ageing and obstruction. *Scand J Urol Nephrol*, 29:45-49
- Homma Y. (2008). Lower urinary tract symptomatology: its definition and confusion. *Int J Urol*, 15:35-43
- Hoyle CH, Chapple C, Burnstock G. (1989). Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P2X-purinoceptors and for purinergic transmission. *Eur J Pharmacol*, 174(1):115-8
- Huisman AB. (1983). Aspects on the anatomy of the female urethra with special relation to urinary continence. *Contrib Gynecol Obstet*, 10:1-31
- Huizinga JD. (2001). Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside II. Gastric motility: lessons from mutant mice on slow waves and innervation. *Am J Physiol*, 281:G1129-G1134
- Huizinga JD, Reed DE, Berezin I, Wang XY, Valdez DT, Liu LW, Diamant NE. (2008). Survival dependency of intramuscular ICC on vagal afferent nerves in the cat esophagus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(2):R302-10
- Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, Burnett AL. (2002). Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *PNAS*, 99(6):4061-4066

- Ikeda Y, Fry C, Hayashi F, Stolz D, Griffiths D, Kanai AJ. (2007). Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: F1018–F1025
- Irwin DE, Milsom I, Hunskaar S, Reilly K, Kopp Z, Herschorn S, Coyne K, Kelleher C, Hampel C, Artibani W, Abrams P. (2006). Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study. *Eur Urol*, 50:1306–14
- Jacob J, Ludgate CM, Forder J, Tulloch S. (1978). Recent observations on the ultrastructure of human urothelium. 1. Normal bladder of elderly subjects. *Cell Tiss Res*, 193(3):543-60
- Jänig W, Morrison JF. (1986). Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog Brain Res*, 67:87-114
- Jeremy JY, Tsang V, Mikhailidis DP, Rogers H, Morgan RJ, Dandona P. (1987). Eicosanoid synthesis by human urinary bladder mucosa: pathological implications. *Br J Urol*, 59:36-39
- Jevtich MJ, Khawand NY, Vidic B. (1990). Clinical significance of ultrastructural findings in the corpora cavernosa of normal and impotent men. *J Urol*, 143:289-93
- Jin L, Liu T, Lagoda GA, Champion HC, Bivalacqua TJ, Burnett AL. (2006). Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age-associated erectile dysfunction. *Faseb J*, 20(3):536-8
- Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. (2000). Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol*, 163:460-463
- Johnson JM, Bivalacqua TJ, Lagoda GA, Burnett AL, Musicki B. (2011). eNOS-uncoupling in age-related erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 23:43-48
- Kageyama S, Fujita K, Suzuki K, Shinbo H, Masuda N, Uchida W. (2000). Effect of age on the responses of rat bladder detrusor strips to adenosine triphosphate. *BJU Int*, 85:899-904
- Kaiser FE. (1991). Sexuality and impotence in the aging man. *Clin Geriatr Med*, 7:63-72
- Karkanis T, DeYoung L, Brock GB, Sims SM. (2003). Ca^{2+} - activated- Cl^{-} channels in corpus cavernosum smooth muscle: a novel mechanism for control of penile erection. *J Appl Physiol*, 94:301-313
- Kavia RBC, Dasgupta R, Fowler CJ. (2005). Functional imaging and the central control of the bladder. *J Comp Neurol*, 493:27-32
- Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. (1996). Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*, 79(3): 363-380
- Kenton K, Lowenstein L, Simmons J, Brubaker L. (2007). Aging and overactive bladder may be associated with loss of urethral sensation in women. *Neurourol Urodyn*, 26(7):981-4
- Khan MA, Thompson CS, Mumtaz FH, Jeremy JY, Morgan RJ, Mikhailidis DP. (1998). Role of prostaglandins in the urinary bladder: an update. *Prostaglandins Leukot Esset Fatty Acids*, 59:415-422

- Kim JC, Park EY, Seo SI, Park YH, Hwang TK. (2006). Nerve growth factor and prostaglandins in urine of female patients with overactive bladder. *J Urol*, 175:1773-1776
- Kim NN, Dhir V, Azadzi KM, Traish AM, Flaherty E, Golstein I. (2002). Pilot study of the endothelin-A receptor selective antagonist BMS-193884 for the treatment of erectile dysfunction. *J Androl*, 23:76-83
- Kim SO, Oh BS, Chang IY, Song SH, Ahn K, Hwang EC, Oh KJ, Kwon D, Park K. (2011). Distribution of interstitial cells of cajal and expression of nitric oxide synthase after experimental bladder outlet obstruction in a rat model of bladder overactivity. *Neurourol Urodyn*, 30(8):1639-45
- Kimura K, Tamura M, Kawanishi Y. (1990). Prostaglandins as possible neurotransmitters for contraction and relaxation in human corpus cavernosum. In: *Proceedings of the IV World Meeting on Impotence* Puech-Leau P. (Ed). Smith-Gordon, 24-25
- Kinder RB, Mundy AR. (1987). Pathophysiology of idiopathic detrusor instability and detrusor hyper-reflexia. *Br J Urol*, 60:509-515
- Kinder RB, Restorick JM, Mundy AR. (1985). Vasoactive intestinal polypeptide in the hyper-reflexic neuropathic bladder. *Br J Urol*, 57:289-291
- Kirpekar SM, Prat JC. (1978). Effect of tetraethylammonium on noradrenaline release from cat spleen treated with tetrodotoxin. *Nature*, 276:623-624
- Knowles RG, Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298:249-258
- Kobayashi H, Adachi-Akahane S, Nagao T. (2000). Involvement of BK_{Ca} channels in the relaxation of detrusor muscle via β -adrenoceptor. *Eur J Pharmacol*, 404:231-238
- Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. (1989). Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*, 14:542-548
- Kolta MG, Wallace LJ, Gerald MC. (1984). Age-related changes in sensitivity of rat urinary bladder to autonomic agents. *Mech Ageing Dev*, 27:183-188
- Komalavilas P, Lincoln TM. (1994). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 269:8701-8107
- Kories C, Czyborra C, Fetscher C, Schneider T, Krege S, Michel MC. (2003). Gender comparison of muscarinic receptor expression and function in rat and human urinary bladder: Differential regulation of M₂ and M₃?. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 367:524-531
- Kosan M, Tul M, Ozturk B, Hafez G, Inal G, Cetinkaya M. (2008). Alteration in contractile responses in human detrusor smooth muscle from obstructed bladders with overactivity. *Urol Int*, 80:193-200
- Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, Shukla N. (2005). Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD(P)H oxidase induced by the thromboxane A₂ mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU Int*, 96:423-7

- Kozlowski MC, Krane RJ, Sirkoy MB, Azadzi M. (1999). Neuroregulation of bladder blood flow during filling and contraction in the rabbit. *J Urol*, 161: 38
- Kubota Y, Hashitani H, Shirasawa N, Kojima Y, Sasaki S, Mabuchi Y, Soji T, Suzuki H, Kohri K. (2008). Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn*, 27(4):330-40
- Kumar V, Chapple CC, Chess-Williams R. (2004). Characteristics of adenosine triphosphate [corrected] release from porcine and human normal bladder. *J Urol*, 172(2):744-7
- Kume H, Mikawa K, Takagi K, Kotlikoff MI. (1995a). Role of G proteins and K_{Ca} channels in the muscarinic and beta-adrenergic regulation of airway smooth muscle. *Am J Physiol*, 268(2 pt 1):L221-9
- Kume H, Takagi K. (1995b). Involvement of G proteins between receptors and K_{Ca} channels in the regulation of airway tone by the autonomic nervous system. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*, 33 Suppl:116-24
- Küthe A, Wiedenroth A, Mägert HJ, Uckert S, Forssmann WG, Stief CG, Jonas U. (2001). Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. *J Urol*, 165(1):280-3
- Lagou M, Drake MJ, Markerink-VAN Ittersum M, De Vente J, Gillespie JJ. (2006a). Interstitial cells and phasic activity in the isolated mouse bladder. *BJU Int*, 98(3):643-50
- Lagou M, Gillespie J, Kirkwood T, Harvey I, Drake MJ. (2006b). Muscarinic stimulation of the mouse isolated whole bladder: physiological responses in young and ageing mice. *Auton autacoid Pharmacol*, 26:253-260
- Lai HH, Boone TB, Thompson TC, Smith CP, Somogyi GT. (2007). Using caveolin-1 knockout mouse to study impaired detrusor contractility and disrupted muscarinic activity in the aging bladder. *Urology*, 69(2):407-11
- Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. (1994). Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 42:1417
- Latifpour J, Fukumoto Y, Weiss RM. (1995). Regional differences in the density and subtype specificity of endothelin receptors in rabbit urinary tract. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 352:459-468
- Latifpour J, Kondo S, O'Hollaren B, Morita T, Weiss RM. (1990). Autonomic receptors in urinary tract: sex and age differences. *J Pharmacol Exp Ther*, 253(2):661-7
- Lecci A, Maggi CA. (2001). Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept*, 101:1-18
- Lee EY, Lee SY, Lee TS, Chi JG, Choi W, Suh YH. (2000b). Ultrastructural changes in microvessel with age in the hippocampus of senescence-accelerated mouse (SAM)-P/10. *Exp Aging Res*, 26:3-14

- Lee HY, Bardini M, Burnstock G. (2000a). Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol*, 163:2002-2007
- Lee JG, Coplen D, Macarak E, Wein AJ, Levin RM. (1994). Comparative studies on the ontogeny and autonomic responses of the fetal calf bladder at different stages of development: Involvement of nitric oxide on field stimulated relaxation. *J Urol*, 151: 1096-1101
- Lee T, Hedlund P, Newgreen D, Andersson KE. (2007). Urodynamic effects of a novel EP1 receptor antagonist in normal rats and rats with bladder outlet obstruction. *J Urol*, 177:1562-67
- Leone AM, Wilklund NP, Hökfelt T, Brundin L, Moncada S. (1994). Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport*, 5:733-736
- Lepor H, Sunaryade I, Hartanti V, Shapiro E. (1992). Quantitative morphology of the adult human bladder. *J Urol*, 148:414-417
- Levin RM, Ruggieri MR, Wein AJ. (1988). Identification of receptor subtypes in the rabbit and human urinary bladder by selective radio-ligand binding. *J Urol*, 139:844-848
- Lewis SA. (2000). Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol*, 278:F867-F874
- Lewis SA, Clausen C, Wills NK. (1991). Transport-related modulation of the membrane properties of urinary bladder epithelium. *Biochim Biophys Acta*, 1070:99-110
- Lewis SA, Hanrahan JW. (1985). Apical and basolateral membrane ionic channels in rabbit urinary bladder epithelium. *Pflugers Arch*, 405:S83-S88
- Li G, Li K, Li Z, Wang P. (2003). Age-dependent changes in β -adrenoceptor function in human detrusor and possible mechanisms. *Chin Med J*, 116:1511-1514
- Li L, Jiang C, Hao P, Li W, Song C, Song B. (2007). Changes of gap junctional cell-cell communication in overactive detrusor in rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(5):C1627-35
- Lin CS, Lin G, Lue TF. (2005). Cyclic nucleotide signaling in cavernous smooth muscle. *J Sex Med*, 2(4): 478-91
- Lin JS, Tsai YS, Lin YM, Lin CS, Chow NH. (2001). Age-associated changes in collagen content and its subtypes within rat corpora cavernosa with computerized histomorphometric analysis. *Urology*, 57:837-42
- Lincoln J, Burnstock G. (1993). Autonomic innervation of the urinary bladder and urethra. En: *The autonomic Nervous System*, vol. III: Nervous control of the urogenital System (ed. Maggi CA) pp 33-68. London: Harwood Academic
- Liu LW, Thuneberg L, Huizinga JD. (1995). Cyclopiazonic acid, inhibiting the endoplasmic reticulum calcium pump, reduces the canine colonic pacemaker frequency. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(2):1058-68

- Liu SH, Lin-Shiau SY. (1997). Enhancement by nitric oxide of neurogenic contraction in the mouse urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 356(6):850-2
- Lluel P, Deplanne V, Heudes D, Bruneval P, Palea S. (2003a). Age-related changes in urethrovesical coordination in male rats: Relationship with bladder instability? *Am J Physiol*, 284:R1287-R1295
- Lluel P, Palea S, Barras M, Grandadam F, Heudes D, Bruneval P, Corman B, Martin DJ. (2000). Functional and morphological modifications of the urinary bladder in aging female rats. *Am J Physiol*, 278:R964-R972
- Lluel P, Salea S, Rbiere P, Barras M, Teillet L, Corman B. (2003b). Increased adrenergic contractility and decreased mRNA expression of NOS III in aging rat urinary bladders. *Fundam Clin Pharmacol*, 17:633-641
- Longhurst PA, Eika B, Leggett RE, Levin RM. (1992). Comparison of urinary bladder function in 6 and 24 month male and female rats. *J Urol*, 148:1615-1620
- Longhurst PA, Levendusky M. (2000). Influence of gender and the oestrous cycle on in vitro contractile responses of the rat urinary bladder to cholinergic stimulation. *Br J Pharmacol*, 131:177-184
- Lue TF. (2003). La disfunción eréctil. *Revista de toxicomanías*, nº35
- Lue TF, Tanagho EA, McClure RD. (1988). Hemodynamics of erection, In: *Contemporary management of impotence and infertility*. Contemporary management of impotence and fertility. Williams & Wilkins, 28-38
- Lukacs B, Leplege A, Thibault P, Jardin A. (1996). Prospective study of men with clinical benign prostatic hyperplasia treated with alfuzosin by general practitioners: 1-year results. *Urology*, 48:731-40
- Madersbacher S, Pycha A, Schatzl G, Mian C, Klingler CH, Marberger M. (1998). The aging lower urinary tract: a comparative urodynamic study of men and women. *Urology*, 51(2):206-12
- Maggi CA. (1992). Prostanoids as local modulators of reflex micturition. *Pharmacol Res*, 25:13-20
- Maggi CA. (1993). The dual, sensory and “efferent” function of the capsaicin-sensitive primary sensory neurons in the urinary bladder and urethra, in *The Autonomic Nervous System*, Chapter 11: Nervous control of the urogenital system (Maggi CA ed) vol 3, pp 383-422, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Maggi CA. (1995). The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol*, 26:911-944
- Maggi CA, Giuliani S, Del Bianco E, Geppetti P, Theodorsson E, Santicioli P. (1992). Calcitonin gene-related peptide in the regulation of urinary tract motility. *Ann NY Acad Sci*, 657:328-343
- Maggi CA, Patacchini R, Santicioli P, Geppetti P, Cecconi R, Giuliani S, Meli A. (1989). Multiple mechanisms in the motor responses of the guinea-pig isolated urinary bladder to bradykinin. *Br J Pharmacol*, 98:619-629

- Mamas MA, Reynard JM, Brading AF. (2003). Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology*, 61:1079-1085
- Mansfield KJ, Liu L, Mitchelson FJ, Moore KH, Millard RJ, Burcher E. (2005). Muscarinic receptor subtypes in human bladder detrusor and mucosa, studied by radioligand binding and quantitative competitive RT-PCR: Changes in ageing. *Br J Pharmacol*, 144:1089-1099
- Mármol F, Sánchez J, López D, Martínez N, Mitjavila MT, Puig-Parellada P. (2009). Oxidative stress, nitric oxide and prostaglandins E₂ levels in the gastrointestinal tract of aging rats. *J Pharm Pharmacol*, 61:201-206
- Martin D, Vaira S, Timmermans LMJ. (1985). Modification de l'innervation autonome intrinsèque vésicale au cours de la sénescence. *CR Soc Biol*, 179:501-508
- Martín-Morales A, Sánchez-Cruz JJ, Saenz de Tejada I, Rodríguez-Vela L, Jiménez-Cruz JF, Burgos-Rodríguez R. (2001). Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the Epidemiología de la Disfunción Erétil Masculina Study. *J Urol*, 166:569-75
- Martínez-Salamanca JI, Martínez-Ballesteros C, Portillo L, Gabancho S, Moncada I, Carballido J. (2010). Physiology of erection. *Arch Esp Urol*, 63(8):581-8
- Mas M. (2009). A close look at the endothelium: Its role in the regulation of vasomotor tone. *Eur Urol*, Suppl 8:48-57
- Mas M. (2010). Molecular mechanism of penile erection. *Arch Esp Urol*, 63(8):589-598
- Maselli MA, Trisolini P, Demma I, Pezzolla F, De Ponti F. (2011). Gender- and age-related differences in muscular and nerve-mediated responses in human colon. *Dig Dis Sci*, 56(2):352-8
- Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, Taketo MM. (2002). Mice lacking M₂ y M₃ muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci*, 22:10627-10632
- Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Yuriko K, Takahashi S, Taketo MM. (2000). Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M₃ subtype. *PNAS*, 97(17): 9579-9584
- Mattiasson A, Andersson KE, Sjögren C. (1985). Adrenergic and non-adrenergic contraction of isolated urethral muscle from rabbit and man. *J Urol*, 133:298-303
- Mazet B, Raynier C. (2004). Interstitial cells of Cajal in the guinea pig gastric antrum: distribution and regional density. *Cell Tissue Res*, Apr 316(1):23-34
- McCafferty GP, Misajet BA, Laping NJ, Edwards RM, Thorneioe KS. (2008). Enhanced bladder capacity and reduced prostaglandin E₂-mediated bladder hyperactivity in EP₃ receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(2):F507-14

- McCloskey KD. (2010). Interstitial cells in the urinary bladder--localization and function. *Neurourol Urodyn*, 29(1):82-7
- McCloskey KD, Gurney AM. (2002). Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol*, 168:832-836
- McHale NG, Hollywood MA, Sergeant GP, Shafei M, Thornbury KT, Ward SM. (2006). Organization and function of ICC in the urinary tract. *J Physiol*, 576(Pt 3):689-94
- McMurray G, Dass N, Brading AF. (1998). Purinoceptor subtypes mediating contraction and relaxation of marmoset urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 123(8):1579-86
- McNeil DL, Traugh NE Jr, Vaidya AM, Hua HT, Papka RE. (1992). Origin and distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons and fibers innervating the urinary bladder of the rat. *Neurosci Lett*, 147:33-36
- McVary K. (2006). Lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction: epidemiology and pathophysiology. *BJU Int*, 97 (suppl 2): 23-28
- Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE, Dietz HG. (2004). Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol*, 172:769-772
- Michel MC, Barendrecht MM. (2008). Physiological and pathological regulation of the autonomic control of urinary bladder contractility. *Pharmacol Ther*, 117:297-312
- Michel MC, Vridag W. (2006). Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol*, 147(suppl 2):S88-119
- Miller MA, Morgan RJ. (1994). Eicosanoids, erections and erectile dysfunction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 51(1):1-9
- Miller MA, Morgan RJ, Thompson CS, Mikhailidis DP, Jeremy J. (1995). Effects of papaverine and VIP on penile and vascular cAMP y cGMP in control and diabetic animals: an in vitro study. *Int J Impot Res*, 7:91-100
- Mills IW, Greenland JE, McMurray G, McCoy R, Ho KM, Noble JG, Brading AF. (2000). Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation. *J Urol*, 163(2):646-51
- Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z. (2002). Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 22(24):8467-77
- Minhas S, Cartledge J, Eardley I. (2000a). The role of prostaglandins in penile erection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 62(3):137-146
- Minhas S, Cartledge J, Eardley I. (2001b). The pathophysiological role of prostaglandins in penile erection. *Exp Opin Pharmacol Ther*, 2(5):799-811

- Minhas S, Cartledge JJ, Eardley I, Joyce AD, Morrison JFB. (2001a). The interaction of nitric oxide and prostaglandins in the control of corporal smooth muscle tone: evidence for production of a cyclooxygenase-derived endothelium-contracting factor. *BJU Int*, 87:882-888
- Minhas S, Eardley I, Joyce AD, Morrison JFB. (2000b). The effect of cyclic GMP on rabbit corporal smooth muscle tone and its modulation by cyclo-oxygenase products. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 62(3):153-160
- Minhas S, Eardley I, Morrison JFB. (1998). Role of endogenous nitric oxide and cyclo-oxygenase products in modulating corporal smooth muscle tone in high tone preparations. *Eur Urol*, 33:p389-98
- Mizuno MS, Pompeu E, Castelucci P, Liberti EA. (2007). Age-related changes in urinary bladder intramural neurons. *Int J Dev Neurosci*, 25(3):141-8
- Mohammed H, Santer RM. (2001). Distribution and changes with age of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves of the rat urinary bladder, ureter and in lumbosacral sensory neurons. *Eur J Morphol*, 39(3):137-144
- Molderings GJ, Göthert M, van Ahlen H, Porst H. (1989). Noradrenaline release in human corpus cavernosum and its modulation via presynaptic alpha 2-adrenoreceptors. *Fundam Clin Pharmacol*, 3:497-504
- Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev*, 57:217-252
- Montgomery BS, Fry CH. (1992). The action potential and net membrane currents in isolated human detrusor smooth muscle cells. *J Urol*, 147:176-184
- Moon A. (2002). Influence of nitric oxide signaling pathways on pre-contracted human detrusor smooth muscle in vitro. *BJU Int*, 89:942-949
- Moore KH, Gilpin SA, Dixon JS, Richmond DH, Sutherst JR. (1992). Increase in presumptive sensory nerves of the urinary bladder in idiopathic detrusor instability. *Br J Urol*, 70:370-372
- Morelli A, Filippi S, Sandner P, Fibbi B, Chavalmane AK, Silvestrini E, Sarchielli E, Vignozzi L, Gacci M, Carini M, Vannelli GB, Maggi M. (2009). Vardenafil modulates bladder contractility through cGMP-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. *J Sex Med*, 6(6):1594-608
- Morita T, Ando M, Kihara K, Kitahara S, Ishizaka K, Matsumura T, Oshima H. (1994). Effects of prostaglandins E1, E2 and F2 α on contractility and cAMP and cGMP contents in lower urinary tract smooth muscle. *Urol Int*, 52:200-203
- Morita T, Ando M, Kihara K, Oshima H, Kondo S, Tashima Y. (1992a). Dissociation of magnitude of relaxation from cyclic AMP levels in rabbit urinary bladder. *J Smooth Muscle Res*, 28:121-128
- Morita T, Iizuka H, Iwata T, Kondo S. (2000). Function and distribution of β 3-adrenoceptors in rat, rabbit and human urinary bladder and external urethral sphincter. *J Smooth Muscle Res*, 36:21-32

- Morita T, Tsujii T, Dokita S. (1992b). Regional difference in functional roles of cAMP and cGMP in lower urinary tract smooth muscle contractility. *Urol Int*, 49:191-195
- Morrison J, Birder L, Craggs M, De Groat WC, Downie J, Drake M, Fowler C, Thor K. (2005). Neural control. In: *Incontinence*, eds. Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A. pp. 363–422. Jersey: Health Publications, Ltd
- Morrison JFB, Pallot DJ, Sheen R, Dhanasekaran S, Mensah-Brown EPK. (2007). The effects of age and streptozotocin diabetes on the sympathetic innervations in the rat penis. *Mol Cell Biochem*, 295:53-58
- Mouli S, McVary KT. (2009). PDE5 inhibitors for LUTS. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 12(4):316-24
- Mucignat-Caretta C, Bondi M, Caretta A. (2004). Endocrine status affects bladder size and postvoid residual urinary volume in mice. *Hormones and Behavior*, 46:11-18
- Mumtaz FH, Dashwood MR, Thompson CS, Sullivan ME, Mikhailidis DP, Morgan RJ. (1999a). Increased expression of endothelin B receptors in the diabetic rabbit urinary bladder: functional relevance. *BJU Int*, 83:113-122
- Mumtaz FH, Khan MA, Thompson CS, Morgan RJ, Mikhailidis DP. (2000). Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. *BJU Int*, 85:567-578
- Mumtaz FH, Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Naseem KM, Bruckdorfer KR, Mikhailidis DP, Morgan RJ. (1999b). Alterations in the nitric oxide synthase binding sites and non-adrenergic, non-cholinergic mediated smooth muscle relaxation in the diabetic rabbit bladder outlet: possible relevance to the pathogenesis of diabetic cystopathy. *J Urol*, 162: 558-66
- Mumtaz FH, Thompson CS, Khan MA, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Angelini GD, Jeremy JY. (1999c). Alterations in the formation of cyclic nucleotides and prostaglandins in the lower urinary tract of the diabetic rabbit. *Urol Res*, 27:470-475
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. (2005). Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis. *J Sex Med*, 2:347-357
- Nathan CF. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6:3051-3064
- National Institutes of Health Consensus Statement. Impotence. (1993). *J Am Med Assoc*, 123:23-27
- Negrete HO, Lavelle J, Berg J, Lewis SA, Zeidel ML. (1996). Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol*, 271:F886-F894
- Nishimoto T, Latifpour J, Wheeler MA, Yoshida M, Weiss RM. (1995). Age-dependent alterations in b-adrenergic responsiveness of rat detrusor smooth muscle. *J Urol*, 153:1701-1705
- Nishizawa O, Kawahara T, Shimoda N, Suzuki K, Fujieda N, Kudo T, Suzuki T, Noto H, Harada T, Tsuchida S. (1992). Effect of methylene blue on the vesicourethral function in the rats. *Tohoku J Exp Med*, 168(4):621-2

- Numao N, Masuda H, Sakai Y, Okada Y, Kihara K, Azuma H. (2007). Roles of attenuated neuronal nitric-oxide synthase protein expression and accelerated arginase activity in impairing neurogenic relaxation of corpus cavernosum in aged rabbits. *BJU Int*, 99:1495-1499
- Ohnishi N, Park YC, Kurita T, Kajimoto N. (1997). Role of ATP and related purine compounds on urethral relaxation in male rabbits. *Int J Urol*, 4(2):191-7
- Ordway GA, Esbenshade TA, Kolta MG, Gerald MC, Wallace LJ. (1986). Effect of age on cholinergic muscarinic responsiveness and receptors in the rat urinary bladder. *J Urol*, 136:492-496
- O'Reilly BA, Kosaka AH, Knight GF, Chang TK, Ford AP, Rymer JM, Popert R, Burnstock G, McMahon SB. (2002). P2X receptors and their role in female idiopathic detrusor instability. *J Urol*, 167:157-164
- Osanai T, Fujita N, Fujiwara N, Nakano T, Takahashi K, Guan W, Okumura K. (2000). Cross talk of shear-induced production of prostacyclin and nitric oxide in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(1):H233-8
- Palea S, Artibani W, Ostardo E, Trist DG, Pietra C. (1993). Evidence for purinergic neurotransmission in human urinary bladder affected by interstitial cystitis. *J Urol*, 150: 2007-2012
- Pandita RK, Mizusawa H, Andersson KE. (2000). Intravesical oxyhemoglobin initiates bladder overactivity in conscious, normal rats. *J Urol*, 164:545-550
- Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS. (1996). Regulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role for nitric oxide. *J Appl Physiol*, 81:1264-1272
- Perlberg S, Caine M. (1982). Adrenergic response of bladder muscle in prostatic obstruction. Its relation to detrusor instability. *Urology*, 20(5):524-7
- Persson CG, Andersson KE. (1976). Adrenoceptor and cholinceptor mediated effects in the isolated urethra of cat and guinea-pig. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 3:415-426
- Persson K, Alm P, Johansson K, Larsson B, Andersson KE. (1993). Nitric oxide synthase in pig lower urinary tract: immunohistochemistry, NADPH diaphorase histochemistry and functional effects. *Br J Pharmacol*, 110:521-530
- Persson K, García-Pascual A, Andersson KE. (1991). Difference in the action of calcitonin gene-related peptide on pig detrusor and vesical arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand*, 143: 45-53
- Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. (1992). Inhibition of the arginine/nitric oxide pathway causes bladder hyperactivity in the rat. *Acta Physiol Scand*, 144(1):107-8
- Persson K, Pandita RK, Aszòdi A, Ahmad M, Pfeifer A, Fässler R, Andersson KE. (2000). Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279 (3):R1112-20
- Pessina F, Valeri A, Dragoni S, Valoti M, Sgaragli G. (2007). Gender-related neuronal and smooth muscle damage of guinea pig isolated urinary bladder from anoxia-glucopenia and reperfusion injury and its relationship to glycogen content. *Neurourol urodyn*, 26:416-423

- Pezzone MA, Watkins SC, Alber SM, King WE, de Groat WC, Chancellor MB, Fraser MO. (2003). Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284:925-929
- Phillips JI, Davies I. (1980). The comparative morphology of the bladder and urethra in young and old female C57BL/1crfa mice. *Exp Gerontol*, 15:551-562
- Phillips RJ, Rhodes BS, Powley TL. (2006). Effects of age on sympathetic innervation of the myenteric plexus and gastrointestinal smooth muscle of Fischer 344 rats. *Anat Embryol*, 211:673-683
- Pierce KL, Regan JW. (1998). Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing. *Life Sci*, 62:1479-83
- Pieri L, Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS. (2008). Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *J Cell Mol Med*, 12(5B):1944-55
- Pinna C, Glass R, Knight GE, Bolego C, Puglisi L, Burnstock G. (2005). Purine- and pyrimidine-induced responses and P2Y receptor characterization in the hamster proximal urethra. *Br J Pharmacol*, 144(4):510-8
- Pinna C, Ventura F, Puglisi L, Burnstock G. (1996). A pharmacological and histochemical study of hamster urethra and the role of urothelium. *Br J Pharmacol*, 119 (4):655-62
- Platas A. (1997). Anatomía Funcional del pene. En: Erección, eyaculación y sus trastornos. Saenz de Tejada I, Allona A. Fomento Salud, SL. Madrid, España. pp 1-12
- Ponglowhapan S, Church DB, Khalid M. (2009). Expression of ciclooxigenase-2 in the canine lower urinary tract with regard to the effects of gonadal status and gender. *Theriogenology*, 71:1276-1288
- Ponglowhapan S, Church DB, Khalid M. (2010). Expression of prostaglandin E₂ receptor subtypes in the canine lower urinary tract varies according to the gonadal status and gender. *Theriogenology*, 74:1450-1466
- Prieto D. (2008). Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int J impot res*, 20:17-29
- Priviero FBM, Leite R, Webb RC, Teixeira CE. (2007). Neurophysiological basis of penile erection. *Acta Pharmacol Sin*, 28(6):751-755
- Prost H, Sharlip ID. (2006). Anatomy and Physiology of Erection. In: Standard Practice in Sexual Medicine. Prost H, Buvat J. Blackwell Publishing
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 54(4):385-95
- Ragazzi E, Chinellato A, Italiano G, Pagano F, Calabrò A. (1996). Characterization on in vitro relaxant mechanism in erectile tissue from rabbits of different ages. *Urol Res*, 24:317-322

- Rajasekaran M, White S, Baquir A, Wilkes N. (2005). Rho-kinase inhibition improves erectile function in aging male brown-norway rats. *J Androl*, 26(2):182-188
- Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. (1992). Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med*, 326(2):90-4
- Ramón y Cajal S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, Vol 2. Maloine, Paris, pg 891-942
- Rasmussen H, Hansen A, Smedts F, Rumessen JJ, Horn T. (2007). CD34-positive interstitial cells of the human detrusor. *APMIS*, 115(11):1260-6
- Rong W, Spyer KM, Burnstock G. (2002). Activation and sensitization of low and high threshold afferent fibres mediated by P2X receptors in the mouse urinary bladder. *J Physiol*, 541:591-600
- Roosen A, Chapple CR, Dmochowski RR, Fowler CJ, Gratzke C, Roehrborn CG, Stief CG, Andersson KE. (2009a). A refocus on the bladder as the originator of storage lower urinary tract symptoms: A systematic review of the latest literature. *Eur Urol*, 56:810-820
- Roosen A, Datta SN, Chowdhury RA, Patel PM, Kalsi V, Elneil S, Dasgupta P, Kessler TM, Khan S, Panicker J, Fry CH, Brandner S, Fowler CJ, Apostolidis A. (2009b). Suburothelial myofibroblasts in the human overactive bladder and the effect of botulinum neurotoxin type A treatment. *Eur Urol*, 55(6):1440-8
- Rother P, Löffler S, Dorschner W, Reibiger I, Bengs T. (1996). Anatomic basis of micturition and urinary continence. Muscle systems in urinary bladder neck during ageing. *Surg Radiol Anat*, 18(3):173-7
- Ruggieri MR, Braverman AS. (2006). Regulation of bladder muscarinic receptor subtypes by experimental pathologies. *Auton Autacoid Pharmacol*, 26:311-325
- Ruggieri MR, Whitmore KE, Levin RM. (1990). Bladder purinergic receptors. *J Urol*, 144:176-181
- Rumessen JJ, Thuneberg L. (1996). Pacemakers cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal. *Scand J Gastroenterol*, 216:82-94
- Russell B, Baumann M, Heidkamp MC, Svanborg A. (1996). Morphometry of the aging female rat urethra. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 7(1):30-6
- Saenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U. (2004). Physiology of erectile function. *J Sex Med*, 1(3):254-65
- Saenz de Tejada I, Blanco R, Goldstein I, Azadzi K, de las Morenas A, Krane RJ, Cohen RA. (1988). Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. *Am J Physiol*, 254(3 Pt 2):H459-67

- Saenz de Tejada I, Carson MP, de las Morenas A, Goldstein I, Traish AM. (1991). Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *Am J Physiol*, 261:H1078-1085
- Saenz de Tejada I, Kim NN, Goldstein I, Traish AM. (2000). Regulation of pre-synaptic alpha adrenergic activity in the corpus cavernosum. *Int J Impot Res*, 12 suppl 1: S20-25
- Saenz de Tejada I, Mueller JD, de Las Morenas A, Machado M, Moreland RB, Krane RJ, Wolfe HJ, Traish AM. (1992). Endothelin in the urinary bladder. I. Synthesis of endothelin-1 by epithelia, muscle and fibroblasts suggests autocrine and paracrine cellular regulation. *J Urol*, 148:1290-1298
- Saito M, Gotoh M, Kato K, Kondo A. (1991). Influence of aging on the rat urinary bladder function. *Urol Int*, 47 Suppl 1:39-42
- Saito M, Kondo A, Gotoh M, Kato K, Levin M. (1993). Age-related changes in the response of the rat urinary bladder to neurotransmitters. *Neurourol Urodyn*, 12:191-200
- Salvemini D, Settle SL, Masfertr JL, Seibert K, Currie MG y Needleman P. (1995). Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol*, 114:1171-78
- Sampson N, Untergasser G, Plas E, Berger P. (2007). The ageing male reproductive tract. *J Pathol*, 211: 206-218
- Sanders KM. (2006). Interstitial cells of Cajal at the clinical and scientific interface. *J Physiol*, 576(3):683-687
- Sanders KM, Ordog T, Koh SD, Ward SM. (2000). A novel pacemaker mechanism drives gastrointestinal rhythmicity. *News Physiol Sci*, 15:291-298
- Sawada N, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K. (2001). cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun*, 280:798-805
- Schneider T, Fetscher C, Michel MC. (2011). Human urinary bladder strip relaxation by the β -adrenoceptor agonist isoprenaline: methodological considerations and effects of gender and age. *Frontiers in Pharmacology* 2 article 11
- Schneider T, Hein P, Michel-Reher M, Michel MC. (2005). Effects of ageing on muscarinic receptor subtypes and function in rat urinary bladder. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 372:71-78
- Schuessler B. (2006). What do we know about duloxetine's mode of action? Evidence from animals to humans. *BJOG*, 113 (suppl 1):5-9
- Seftel AD. (2003). Erectile dysfunction in the elderly: epidemiology, etiology and approaches to treatment. *J Urol*, 169:1999-2007
- Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD, McHale NG. (2000). Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. *J Physiol*, 526:359-366

- Sergeant GP, Thornbury KD, McHale NG, Hollywood MA. (2002). Characterization of norepinephrine-evoked inward currents in interstitial cells isolated from the rabbit urethra. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(3):C885-94
- Sergeant GP, Thornbury KD, McHale NG, Hollywood MA. (2006). Interstitial cells of Cajal in the urethra. *J Cell Mol Med*, 10(2):280-91
- Shafik A. (2007). Study of interstitial cells in the penis: Human study. *J Sex Med*, 4:66-71
- Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, Shafik I. (2004). Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker. *Urology*, 64:809-813
- Shen ZJ, Jin XD, Chen ZD, Shi YH. (2001). Effect of aging on penile ultrastructure. *Asian J Androl*, 3:281-284
- Shimoda N, Takakusaki K, Nishizawa O, Tsuchida S, Mori S. (1992). The changes in the activity of pudendal motoneurons in relation to reflex micturition evoked in decerebrate cats. *Neurosci Lett*, 135(2):175-8
- Shuttleworth CW, Xue C, Ward SM, de Vente J, Sanders KM. (1993). Immunohistochemical localization of 3'5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: Responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurones. *Neuroscience*, 56:513-522
- Sigala S, Peroni A, Mirabella G, Fornari S, Palazzolo F, Pezzotti G, Simeone C, Cunico SC, Spano P. (2004). Alpha1 adrenoceptor subtypes in human urinary bladder: sex and regional comparison. *Life Sci*, 76(4):417-27
- Silva C, Ribeiro MJ, Cruz F. (2002). The effect of intravesical resiniferatoxin in patients with idiopathic detrusor instability suggests that involuntary detrusor contractions are triggered by C-fiber input. *J Urol*, 168(2):575-9
- Silva WA, Karra MM. (2004). Anatomy and physiology of the pelvic floor. *Minerva Ginecol*, 56:283-302
- Simonsen U, Prieto D, Hernández M, García-Sacristán A. (1997a). Adrenoceptor-mediated regulation of the contractility in horse penile resistance arteries. *J Vasc Res*, 34: 90-102
- Simonsen U, Prieto D, Hernández M, García-Sacristán A. (1997b). Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitrgic neurotransmission in horse penile resistance arteries. *J Urol*, 157:2356-2360
- Sironi G, Colombo D, Poggesi E, Leonardi A, Testa R, Rampin O, Bernabe J, Giuliano F. (2000). Effects of intracavernous administration of selective antagonists of alpha-1-adrenoceptor subtypes on erection in anesthetized rats and dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 292:974-981
- Sisson S. (1973). Sistema urogenital. En: *Anatomía de los animales domésticos*. Salvat Editores, S.A. Mallorca, 43. Barcelona. 4ª Edición. Pg 544-559

- Sjögren C, Andersson KE, Husted S, Mattiasson A, Møller-Madsen, B. (1982). Atropine resistance of transmurally stimulated isolated human bladder muscle. *J Urol*, 128:1368-1371
- Sjögren C, Andersson KE, Mattiasson A. (1985). Effects of vasoactive intestinal polypeptide on isolated urethral and urinary bladder smooth muscle from rabbit and man. *J Urol*, 133:136-140
- Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, De Vente J. (1996). Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunochemistry. *Neuroscience*, 71:337-348
- Smet PJ, Moore KH, Jonavicius J. (1997). Distribution and colocalization of calcitonin gene-related peptide, tachykinins and vasoactive intestinal peptide in normal and idiopathic unstable human urinary bladder. *Lab Invest*, 77:37-49
- Smith CP, Rocha JN, Boone TB, Chancellor MB, de Groat WC, Somogyi GT. (2002). ATP and glutamate release in the spinal cord during increased bladder afferent activity. *SFN 32nd Annual Meeting November 2-7; Orlando, FL. Program No 68.1, Society for Neuroscience, Washington, DC*
- Smith PP, DeAngelis A, Kuchel GA. (2012). Detrusor expulsive strength is preserved, but responsiveness to bladder filling and urinary sensitivity is diminished in the aging mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302:R577-R586
- Smith PR, Mackler SA, Weiser PC, Brooker DR, Ahn YJ, Harte BJ, McNulty KA, Kleyman TR. (1998). Expression and localization of epithelial sodium channel in mammalian urinary bladder. *Am J Physiol*, 274:F91-F96
- Sohal GS, Ali MM, Farooqui FA. (2002). A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *Int J Dev Neurosci*, 20:619-626
- Soler R, Füllhase C, Lu B, Bishop CE, Andersson KE. (2010). Bladder dysfunction in a new mutant mouse model with increased superoxide--lack of nitric oxide? *J Urol*, 183(2):780-5
- Somogyi GT, de Groat WC. (1992). Evidence for inhibitory nicotinic and facilitatory muscarinic receptors in cholinergic nerve terminals of the rat urinary bladder. *J Auton Nerv Syst*, 37:89-98
- Somogyi GT, Tanowitz M, de Groat WC. (1995). Prejunctional facilitatory alpha 1-adrenoceptors in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol*, 114(8):1710-1716
- Somogyi GT, Zernova GV, Yoshiyama M, Yamamoto T, de Groat WC. (1998). Frequency dependence of muscarinic facilitation of transmitter release in urinary bladder strips from neurally intact or chronic spinal cord transected rats. *Br J Pharmacol*, 125:241-246
- Song SH, Joo HT, Cho HW, Hwang HW, Lee KH, Kim DK. (2011). Sex- and age-related changes in connexin 43 expression in normal rat bladder. *Int Neurourol J*, 15(1):25-8
- Sprot RL. (1994). A brief history of the development of animal models for aging research: The place of SAM model of senescence, Takeda, T. (editor), pp.29-34, *Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam*

- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, deMiguel F. (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol*, 172:1175-1178
- Stevens A, Lowe J. (1998). Aparato urinario. En: *Histología Humana*. 2ª Edición. Elsevier. Madrid Pág. 293-325
- Stevens LA, Chapple CR, Chess-Williams R. (2007). Human idiopathic and neurogenic overactive bladders and the role of M2 muscarinic receptors in contraction. *Eur Urol*, 52(2):531-8
- Strasser H, Tiefenthaler M, Steinlechner M, Eder I, Bartsch G, Konwalinka G. (2000). Age dependent apoptosis and loss of rhabdosphincter cells. *J Urol*, 164(5):1781-5
- Stuehr DJ, Soo Kwon N, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. (1991). N^w-Hidroxy-L-arginine is a intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem*, 266:6259-6263
- Suadicaní SO, Urban-Maldonado M, Tar MT, Melman A, Spray DC. (2009). Effects of ageing and streptozotocin-induced diabetes on connexin43 and P2 purinoceptor expression in the rat corpora cavernosa and urinary bladder. *BJU Int*, 103:1686-1693
- Sui GP, Wu C, Fry CH. (2004). Electrical characteristics of suburothelial cells isolated from the human bladder. *J Urol*, 171:938-943
- Sui GP, Wu C, Roosen A, Ikeda Y, Kanai AJ, Fry CH. (2008). Modulation of bladder myofibroblast activity: implications for bladder function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(3):F688-97
- Sullivan ME, Dashwood MR, Thompson CS, Muddle JR, Mikhailidis DP, Morgan RJ. (1997). Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetic rabbits: potential relevance to the pathogenesis of the erectile dysfunction. *J Urol*, 158:1966-1972
- Sun Y, Chai TC. (2004). Up-regulation of P2X3 receptor during stretch of bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *J Urol*, 171:448-452
- Susset JG, Servot-Viguié D, Lamy F, Madernas P, Black R. (1978). Collagen in 155 human bladders. *Invest Urol*, 16:204
- Suzuki Y, Moriyama N, Okaya Y, Nishimatsu H, Kawabe K, Aisaka K. (1999). Age-related change of the role of α_{1L} -adrenoceptor in canine urethral smooth muscle. *Gen Pharmacol*, 33:347-354
- Swaiman KF, Bradley WE. (1967). Quantitation of collagen in the wall of the human urinary bladder. *J Appl Physiol*, 22(1):122-4
- Széll EA, Yamamoto T, de Groat WC, Somogyi GT. (2000). Smooth muscle and parasympathetic nerve terminals in the rat urinary bladder have different subtypes of $\alpha(1)$ adrenoceptors. *Br J Pharmacol*, 130(7):1685-1691
- Szigeti GP, Somogyi GT, Csernoch L, Széll EA. (2005). Age-dependence of the spontaneous activity of the rat urinary bladder. *J Muscle Res Cell Motil*, 26(1):23-9

- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, Salvetti A. (2001). Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension*, 38:274-279
- Takahashi Y, Ishii N, Lue TF, Tanagho EA. (1992a). Effects of adenosine triphosphate on canine penile erection. *Int J Impot Res*, 4:27-34
- Takahashi Y, Ishii N, Lue TF, Tanagho EA. (1992b). Effects of adenosine on canine penile erection. *J Urol*, 148:1323-1325
- Takayama I, Horiguchi K, Daigo Y, Mine T, Fujino MA, Ohno S. (2002). The interstitial Cells of Cajal and a Gastroenteric Pacemaker System. *Arch Histol Cytol*, 65:1-26
- Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. (1997). Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol*, 32(1-2):105-9
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev*, 17:183-194
- Takeuchi T, Niioka S, Yamaji M, Okishio Y, Ishii T, Nishio H, Takatsuji K, Hata F. (1998). Decrease in participation of nitric oxide in nonadrenergic noncholinergic relaxation of rat intestine with age. *Jpn J Pharmacol*, 78:293-302
- Taki N, Taniguchi T, Okada K, Moriyama N, Muramatsu I. (1999). Evidence for predominant mediation of $\alpha 1$ -adrenoceptor in the tonus of entire urethra of women. *J Urol*, 162(5):1829-32
- Tang EHC, Vanhoutte PM. (2008). Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics*, 32:409-418
- Tarcn T, Siroky MB, Krane RJ, Azadzo KM. (2000). Isoprostane 8-epi PGF 2α , a product of oxidative stress, is synthesized in the bladder and causes detrusor smooth muscle contraction. *Neurourol Urodyn*, 19:43-51
- Teixeira CE, Baracat JS, Zanesco A, Antunes E, De Nucci G. (2004). Atypical b-adrenoceptor subtypes mediate relaxations of rabbit corpus cavernosum. *J Pharm Exp Ther*, 309:587-593
- Teixeira CE, Jin L, Priviero FB, Ying Z, Webb RC. (2007). Comparative pharmacological analysis of Rho-kinase inhibitors and identification of molecular components of Ca $^{2+}$ sensitization in the rat lower urinary tract. *Biochem Pharmacol*, 74 (4):647-58
- Tempest HV, Dixon AK, Turner WH, Elneil S, Sellers LA, Ferguson DR. (2004). P2X and P2X receptor expression in human bladder urothelium and changes in interstitial cystitis. *BJU Int*, 93(9):1344-8
- Thompson CS, Mumtaz FH, Khan MA, Wallis RM, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Angelini GD, Jeremy JY. (2001). The effect of sildenafil on corpus cavernosal smooth muscle relaxation and cyclic GMP formation in the diabetic rabbit. *Eur J Pharmacol*, 425(1):57-64

- Tobin G, Sjögren C. (1995). In vivo and in vitro effects of muscarinic receptor antagonists on contractions and release of [³H]acetylcholine in the rabbit urinary bladder. *Eur J Pharmacol*, 281:1-8
- Tong YC, Broderick G, Hypolite J, Levin RM. (1992). Correlations of purinergic, cholinergic and adrenergic functions in rabbit corporal cavernosal tissue. *Pharmacology*, 45:241-249
- Torihashi S, Ward SM, Sanders KM. (1997). Development of c-kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology*, 112:144-155
- Toselli P, Moreland R, Traish AM. (1994). Detection of m2 muscarinic acetylcholine receptor mRNA in human corpus cavernosum by in-situ hybridization. *Life Sci*, 55:621-627
- Tostes RC, Carneiro FS, Lee AJ, Giachini FR, Leite R, Osawa Y, Webb RC. (2008). Cigarette smoking and erectile dysfunction: focus on NO bioavailability and ROS generation. *J Sex Med*, 5(6):1284-95
- Traish AM, Gupta S, Toselli P, Saenz de tejada I, Goldstein I, Moreland RB. (1995c). Identification of α 1-adrenergic receptor subtypes in human corpus cavernous tissue and in cultured trabecular smooth muscle cells. *Receptor*, 5:145-157
- Traish AM, Moreland RB, Huang YH, Goldstein I. (1997). Expression of functional alpha-2-adrenergic receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured trabecular smooth muscle cells. *Recept Signal Transduct*, 7:55-67
- Traish AM, Netsuwan N, Daley J, Padman-Nathan H, Goldstein I, Saenz de tejada I. (1995b). A heterogeneous population of α 1 adrenergic receptors mediates contraction of human corpus cavernosum smooth muscle to norepinephrine. *J Urol*, 153:222-227
- Traish AM, Palmer MS, Goldstein I, Moreland RB. (1995a). Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. *Receptor*, 5:159-176
- Triguero D, Prieto D, García-Pascual A. (1993). NADPH-diaphorase and NANC relaxations are correlated in the sheep urinary tract. *Neurosci Lett*, 163:93-96
- Triguero D, Sancho M, García-Flores M, García-Pascual A. (2009). Presence of cyclic nucleotide-gated channels in the rat urethra and their involvement in nerve-mediated nitrergic relaxation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297(5):F1353-60
- Ueno M, Sakamoto H, Kanenishi K, Onodera M, Akiguchi I, Hosokawa M. (2001). Ultrastructural and permeability features of microvessels in the periventricular area of senescence-accelerated mice (SAM). *Microsc Res Tech*, 53:232-238
- Van der AA F, Roskams T, Blyweert W, Ost D, Bogaert G, De Ridder D. (2004). Identification of kit positive cells in the human urinary tract. *J Urol*, 171: 2492-2496
- Van der Werf BA, Creed KE. (2002). Mechanical properties and innervation of the smooth muscle layers of the urethra of greyhounds. *BJU Int*, 90(6):588-95

- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ, Schiffmann SN. (1999). CD34+ cells in human intestine are fibroblasts adjacent to, but distinct from, interstitial cells of Cajal. *Lab Invest*, 79(1):59-65
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ, Schiffmann SN. (2000). CD34 immunoreactivity and interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res*, 302(2):145-53
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Liu H, Descamps D, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ. (1996). Interstitial cells of Cajal in human colon and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*, 111:901-910
- Vishwajit S, Andersson KE. (2009). Terminology of Lower Urinary Tract Symptoms. *ScientificWorldJournal*, 9:17-2
- Wagg A, Cohen M. (2002). Medical therapy for the overactive bladder in the elderly. *Age Ageing*, 31(4):241-6
- Walden PD, Durkin MM, Lepor H, Wetzel JM, Gluchowski C, Gustafson EL. (1997). Localization of mRNA and receptor binding sites for the alpha 1a-adrenoceptor subtype in the rat, monkey and human urinary bladder and prostate. *J Urol*, 157(3):1032-8
- Walsh MP, Thornbury K, Cole WC, Sergeant G, Hollywood M, McHale N. (2011). Rho-associated kinase plays a role in rabbit urethral smooth muscle contraction, but not via enhanced myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 300(1): F73-85
- Wang EC, Lee JM, Johnson JP, Kleyman T, Bridges R, Apodaca G. (2003). Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium. *Am J Physiol*, 285:F651-F663
- Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, Cockayne DA, Birder LA, Apodaca G. (2005). ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest*, 115(9):2412-22
- Warburton AL, Santer RM. (1994). Sympathetic and sensory innervation of the urinary tract in young adult and aged rats: a semi-quantitative histochemical and immunohistochemical study. *Histochemical Journal*, 26:127-133
- Ward SM, Beckett AH, Wang XY, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. (2000b). Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci*, 20:1393-1403
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. (1994). Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol*, 480(1):91-97
- Ward SM, Ordog T, Koh SD, Abu Baker S, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM. (2000a). Pacemaking of interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol*, 525:355-361

- Ward SM, Sanders KM. (2001). Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281:G602-G611
- Warner T, Mitchell JA, Sheng H, Murad F. (1994). Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. *Adv Pharmacol*, 26:171-194
- Watanabe H, Yamamoto TY. (1979). Autonomic innervation of the muscles in the wall of the bladder and proximal urethra of male rats. *J Anat*, 128(Pt 4):873-86
- Way KJ, Reid JJ. (1999). The effects of diabetes on nitric oxide-mediated responses in rat corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*, 376 (1-2):73-82
- Weihe E, Tao-Cheng JH, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE. (1996). Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(8):3547-52
- Wein AJ, Kavousi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. (2007). *Campbell-Walsh Urology*. 9th edition. Saunders, Elsevier 61
- Werkström V, Ny L, Persson K, Andersson KE. (1997). Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *Br J Pharmacol*, 120(2):312-8
- Wespes E. (2000). Erectile dysfunction in the ageing man. *Curr Opin Urol*, 10(6):625-8
- Wespes E, Sattar AA, Golzarian J, Wery D, Daoud N, Schulman CC. (1997). Corporeal veno-occlusive dysfunction: Predominantly intracavernous muscular pathology. *J Urol*, 157:1678-80
- Wheeler MA, Ayyagari RR, Wheeler GL, Weiss RM. (2005). Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. *J Smooth Muscle Res*, 41(1):1-21
- Wingard CJ, Lewis R, Mills TM. (2001). Erection and NO override the vasoconstrictive effect of α -adrenergic stimulation in the rat penile vasculature. *Int J Impot Res*, 13:212-220
- Wolf-Johnston AS, Beckel JM, Barrick SR, Kanai AJ, de Groat WC, Birder L. (2004). Induction of urinary cystitis results in increased expression of nerve growth factor and its receptors. *Soc Neurosci Abstr*, 26:742-16
- Wong MS, Vanhoutte PM. (2010). COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31:1095-1102
- Wong SL, Leung FP, Lau CW, Au CL, Yung LM, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Gollasch M, Huang Y. (2009). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F₂ α mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res*, 104:228-235
- Wu C, Bayliss M, Newgreen D, Mundy AR, Fry CH. (1999). A comparison of the mode of action of ATP and carbachol on isolated human detrusor smooth muscle. *J Urol*, 162:1840-1847

- Wu C, Sui G, Fry CH. (2002). The role of the L-type Ca^{2+} channel in refilling functional intracellular Ca^{2+} stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol*, 538 (pt 2):357-69
- Wu C, Sui GP, Fry CH. (2004). Purinergic regulation of guinea pig suburothelial myofibroblasts. *J Physiol*, 559(pt 1):231-43
- Wuest M, Hiller N, Braeter M, Hakenberg OW, Wirth MP, Ravens U. (2007). Contribution of Ca^{2+} influx to carbachol-induced detrusor contraction is different in human urinary bladder compared to pig and mouse. *Eur J Pharmacol*, 565(1-3):180-9
- Wuest M, Morgenstern K, Graf EM, Braeter M, Hakenberg OW, Wirth MP, Ravens U. (2005). Cholinergic and purinergic responses in isolated human detrusor in relation to age. *J Urol*, 173(6): 2182-2189
- Yagi K, Komura S, Sasaguri Y, Yoshino K, Ohishi N. (1995). Atherogenic change in the thoracic aorta of the senescence-accelerated mouse. *Atherosclerosis*, 118:233-236
- Yamamoto T, Ghosh R, de Groat WC, Somogyi GT. (2001). Facilitation of transmitter release in the urinary bladders of neonatal and adult rats via α_1 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, 414:31-5
- Yang D, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM, Feletou M. (2003). Specific potentiation of endothelium-dependent contractions in SHR by tetrahydrobiopterin. *Hypertension*, 41:136-42
- Yokoyama O, Yusup A, Oyama N, Aoki Y, Miwa Y, Akino H. (2007). Improvement in bladder storage function by tamsulosin depends on suppression of C-fiber urethral afferent activity in rats. *J Urol*, 177(2):771-5
- Yoshida M, Akaike T, Inadome A, Takahashi W, Seshita H, Yono M, Goto S, Maeda H, Ueda S. (1998). The possible effect of nitric oxide on relaxation and noradrenaline release in the isolated rabbit urethra. *Eur J Pharmacol*, 357: 213 – 219
- Yoshida M, Homma Y, Inadome A, Yono M, Seshita H, Miyamoto Y, Murakami S, Kawabe K, Ueda S. (2001). Age-related changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in human isolated bladder smooth muscles. *Exp Gerontol*, 36:99-109
- Yoshida M, Inamode A, Murakami S. (2003). Pharmacological analysis of neurotransmitters contributing to lower urinary tract function. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 121(5):307-16
- Yoshida M, Latifpour J, Nishimoto T, Weiss R. (1991). Pharmacological characterization of α adrenergic receptors in the young and old female rabbit urethra. *J Pharmacol Exp Ther*, 257(3):1100-8
- Yoshida M, Miyamae K, Iwashita H, Otani M, Inamode A. (2004). Management of detrusor dysfunction in the elderly: Changes in acetylcholine and adenosine triphosphate release during aging. *Urology*, 63 suppl 3A:17-23
- Yoshimura N. (1999). Bladder afferent pathway and spinal cord injury: possible mechanisms inducing hyperreflexia of the urinary bladder. *Prog Neurobiol*, 57:583-606

- Yoshimura N, de Groat WC. (1997). Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol*, 4(2):111-25
- Yoshimura N, Kaiho Y, Miyazato M, Yunoki T. (2008). Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 377:437-448
- Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF. (1996). Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol*, 180:97-107
- Yu HJ, Wein AJ, Levin RM. (1996). Age-related differential susceptibility to calcium channel blocker and low calcium medium in rat detrusor muscles: response to field stimulation. *Neurourol Urodynam*, 15:563-576
- Yu W, Hill WG, Apodaca G, Zeidel ML. (2011). Expression and distribution of transient receptor potential (TRP) channels in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 300(1): F49-59
- Zeidel ML. (1996). Low permeabilities of apical membranes of barrier epithelia: what makes water-tight membranes water-tight? *Am J Physiol*, 271:F243-F245
- Zhao W, Aboushwareb T, Turner C, Mathis C, Bennett C, Sonntag WE, Andersson KE, Christ G. (2010). Impaired bladder function in aging male rats. *J Urol*, 184:378-385
- Zhou Y, Ling EA. (1998). Colocalization of nitric oxide synthase and some neurotransmitters in the intramural ganglia of the guinea pig urinary bladder. *J Comp Neurol*, 394:496-505
- Zhou Y, Ling EA. (1999). Nitric oxide synthase--its distribution and alteration in the intramural ganglia of the urinary bladder in normal and urethra-obstructed guinea pigs. *Ann Acad Med Singapore*, 28(1):49-61
- Zhu BH, Ueno M, Matsushita T, Fujisawa H, Seriu N, Nishikawa T, Nishimura Y, Hosokawa M. (2001). Effects of aging and blood pressure on the structure of the thoracic aorta in SAM mice: a model of age-associated degenerative vascular changes. *Exp Gerontol*, 36:111-124
- Zygmunt P, Persson K, Alm P, Larsson B, Andersson K-E. (1993). The L-arginine nitric oxide pathway in the rabbit urethral lamina propria. *Acta Physiol Scand*, 148:431-439

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**Modificaciones inducidas por el envejecimiento en el
tracto genitourinario: análisis en un modelo de
senescencia prematura**

TOMO II

Tesis doctoral
Aránzazu Lafuente Sanchis
Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**Modificaciones inducidas por el envejecimiento en el
tracto genitourinario: análisis en un modelo de
senescencia prematura**

TOMO II

Memoria presentada por Aránzazu Lafuente Sanchis
para optar al grado de Doctor

Directores de la Tesis: Dra. Ángeles García Pascual
y Dr. Domingo Triguero Robles

Madrid, 2012

VºBº Directores

Ángeles García Pascual

Domingo Triguero Robles

Trabajo financiado por: Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-15135-C02-01). Universidad Complutense de Madrid (UCM GR85/06); UCM- Comunidad de Madrid (CCG07-UCM/SAL-2150), UCM-Banco Santander Central Hispano (920307-GR58/08, GR35/10-A-920307) y Fundación Mutua Madrileña (FMN 2011). El desarrollo de la tesis ha sido posible gracias a la percepción de una beca FPU del MEC (AP2006-02480).

IV. RESULTADOS (TABLAS Y FIGURAS)

4.1. DIFERENCIAS EN EL ESTADO DE SALUD GENERAL Y UROLÓGICA ENTRE RATONES SAM-R1 Y SAM-P8

4.1.1. Cambios en el aspecto externo de los animales

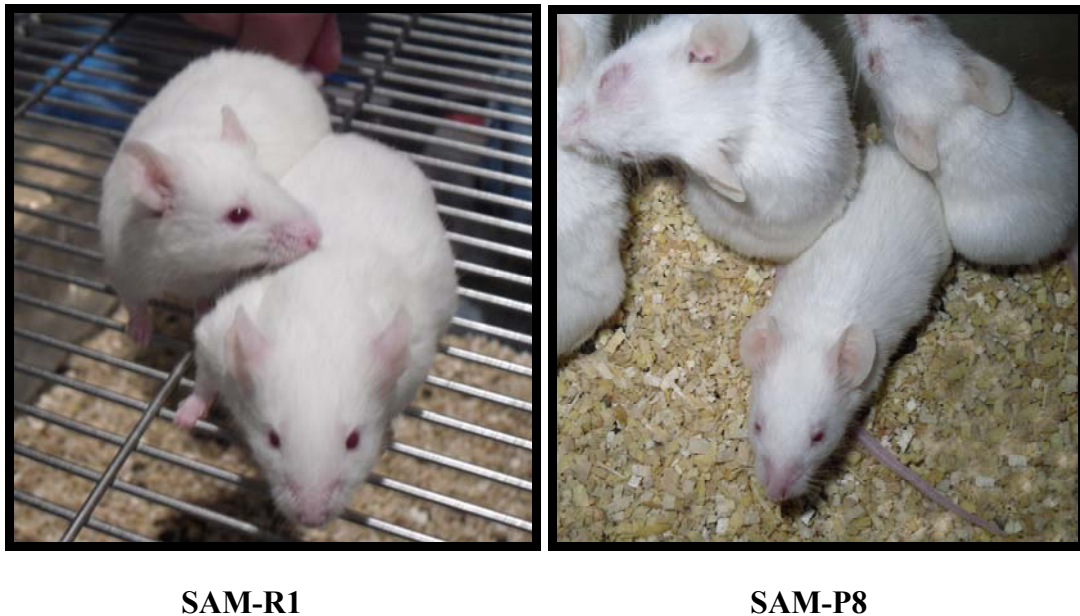


Figura 1. Aspecto externo de los animales (machos).

4.1.2. Variaciones en el peso corporal y de los órganos genitourinarios

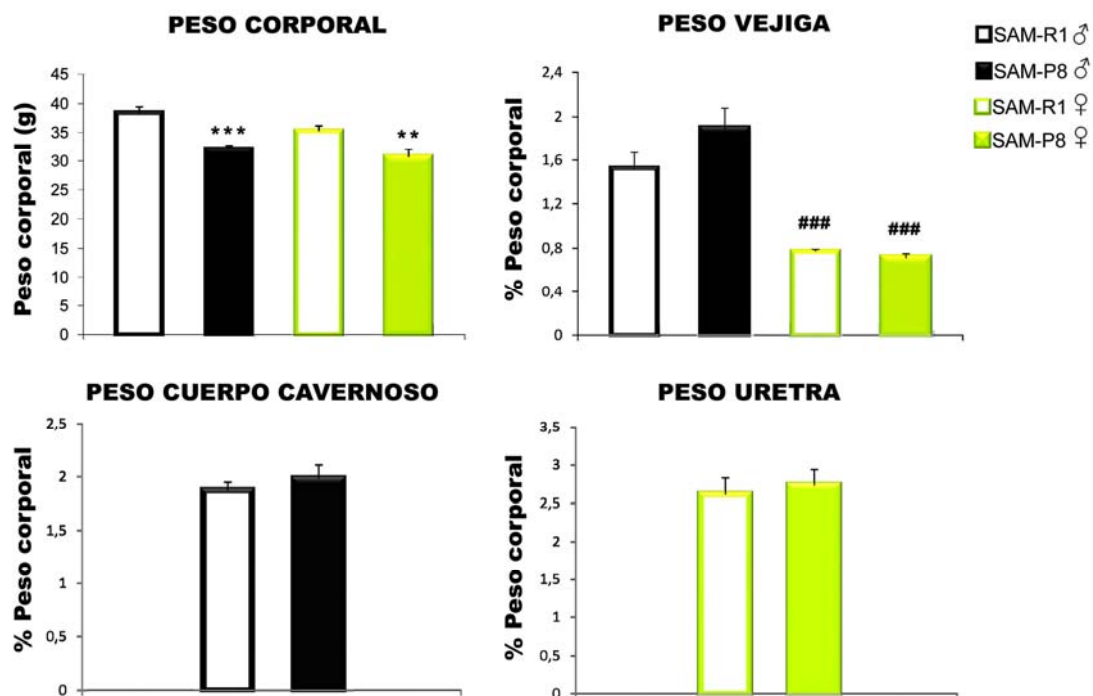


Figura 2. Peso corporal y peso de los órganos genitourinarios ($n = 30$). Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ indica diferencias significativas respecto a SAM-R1; ### $p < 0,001$ indica diferencias significativas respecto a los machos.

4.1.3. Cambios en el patrón miccional

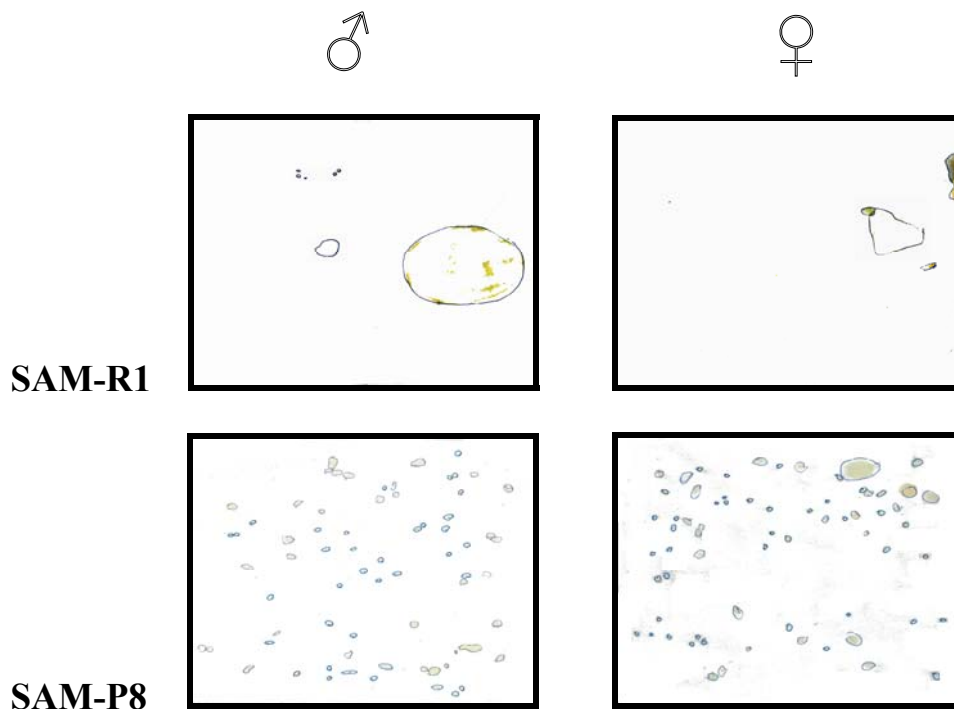


Figura 3. Funcionalidad vesical. Registros representativos de la evaluación de la frecuencia miccional (número de micciones por hora) total y de pequeño volumen (diámetro inferior a 0,5 cm) en cada animal.

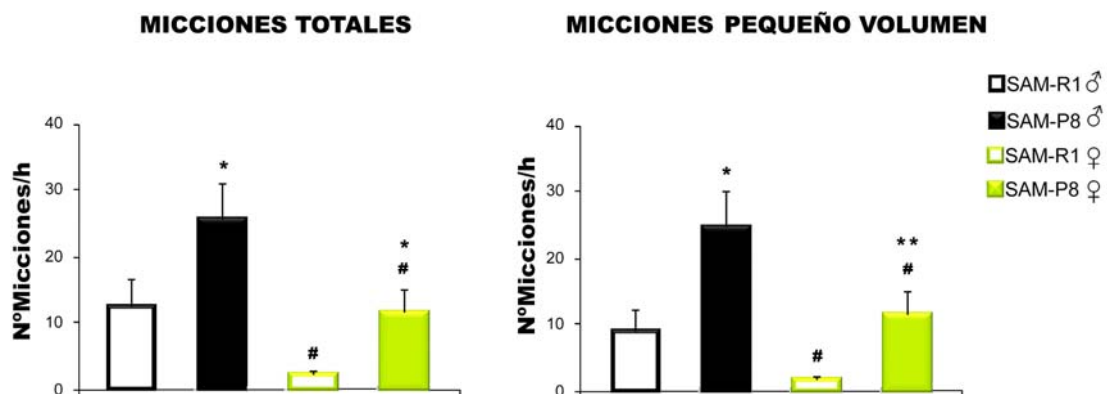


Figura 4. Valores medios del número de micciones totales y de pequeño volumen en cada grupo ($n = 27-28$). Los valores están expresados como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ indica diferencias significativas respecto a SAM-R1; # $p < 0,05$ indica diferencias significativas respecto a los machos.

4.2. VEJIGA

4.2. VEJIGA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1

4.2.1. Cambios estructurales

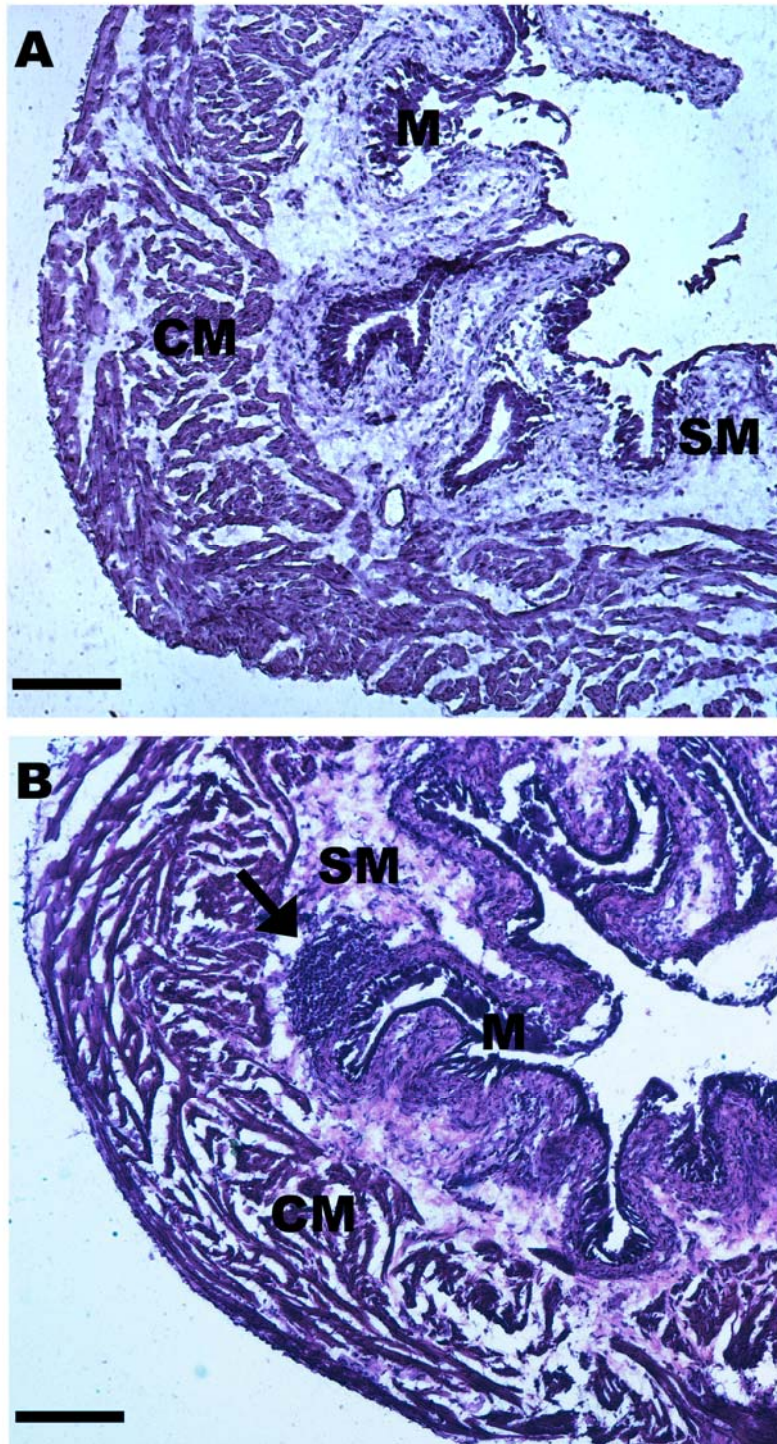


Figura 5. Microfotografías de cortes transversales de vejiga (región del detrusor) teñidos con hematoxilina-eosina. A. Hembra SAM-R1. B. Hembra SAM-P8. M: mucosa, SM: submucosa, CM: capa muscular. La flecha indica una zona con infiltración celular en la capa de la submucosa SAM-P8. Barra=200 μ m.

4.2.2. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por una alta concentración de K^+ extracelular

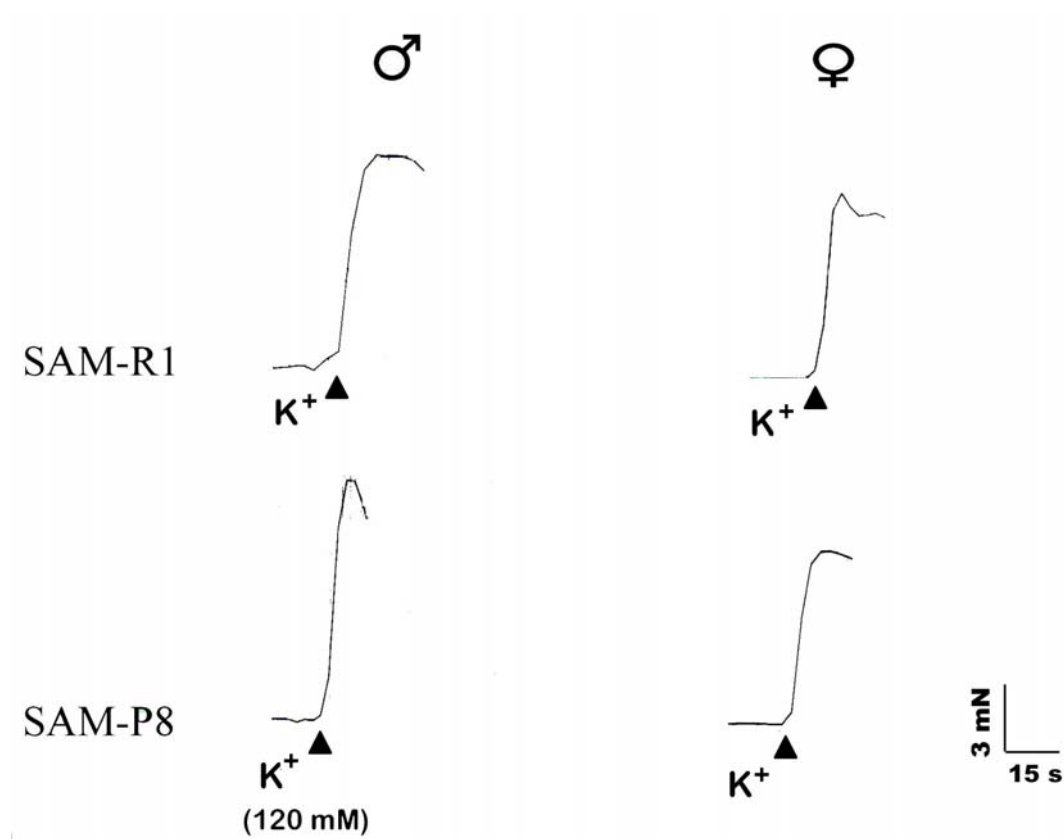


Figura 6. Registros representativos de la respuesta contráctil inducida por K^+ (120 mM) en preparaciones longitudinales de músculo liso de vejiga de ratones SAM-P8 y SAM-R1 de ambos sexos.

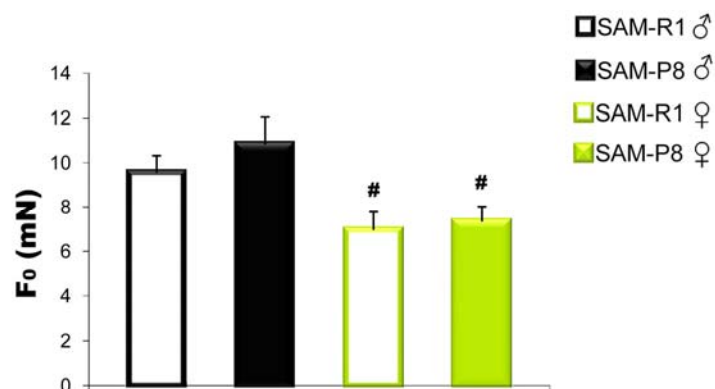


Figura 7. Valores medios de la respuesta contráctil inducida por K^+ (120 mM) en preparaciones vesicales de ratones SAM-P8 y SAM-R1 de ambos sexos. Los valores están expresados como media \pm error estándar de la media ($n = 17-18$). # $p < 0,05$ indica diferencias significativas respecto a los machos.

4.2.3. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por EFS

4.2.3.1. Hembras

a) Respuesta contráctil inducida por EFS en la vejiga de ratones hembra

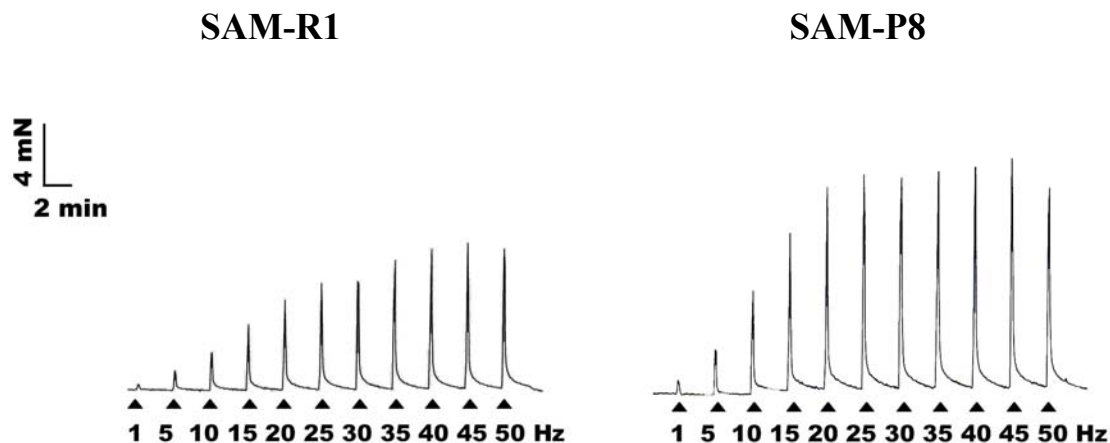


Figura 8. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por EFS en preparaciones longitudinales de músculo liso de vejiga hembra SAM-R1 y SAM-P8.

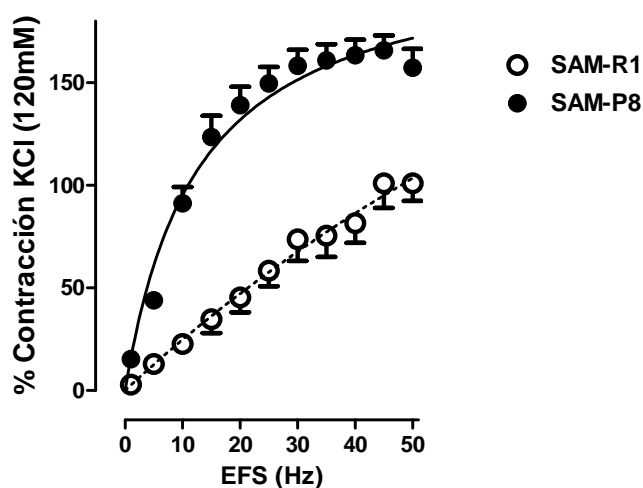


Figura 9. Curva frecuencia-respuesta inducida por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de músculo liso de vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 13-14$).

SAM-R1			SAM-P8		
EF ₅₀	E _{max} (45 Hz)	n	EF ₅₀	E _{max} (45 Hz)	n
20,5 \pm 1,2	101,0 \pm 12,0	14	10,8 \pm 1,6 ***	165,7 \pm 7,3 ***	13

Tabla 1. Valores de potencia (EF₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de las curvas frecuencia-respuesta inducidas por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de músculo liso de vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. ***p<0,001 señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

b) Mediadores implicados

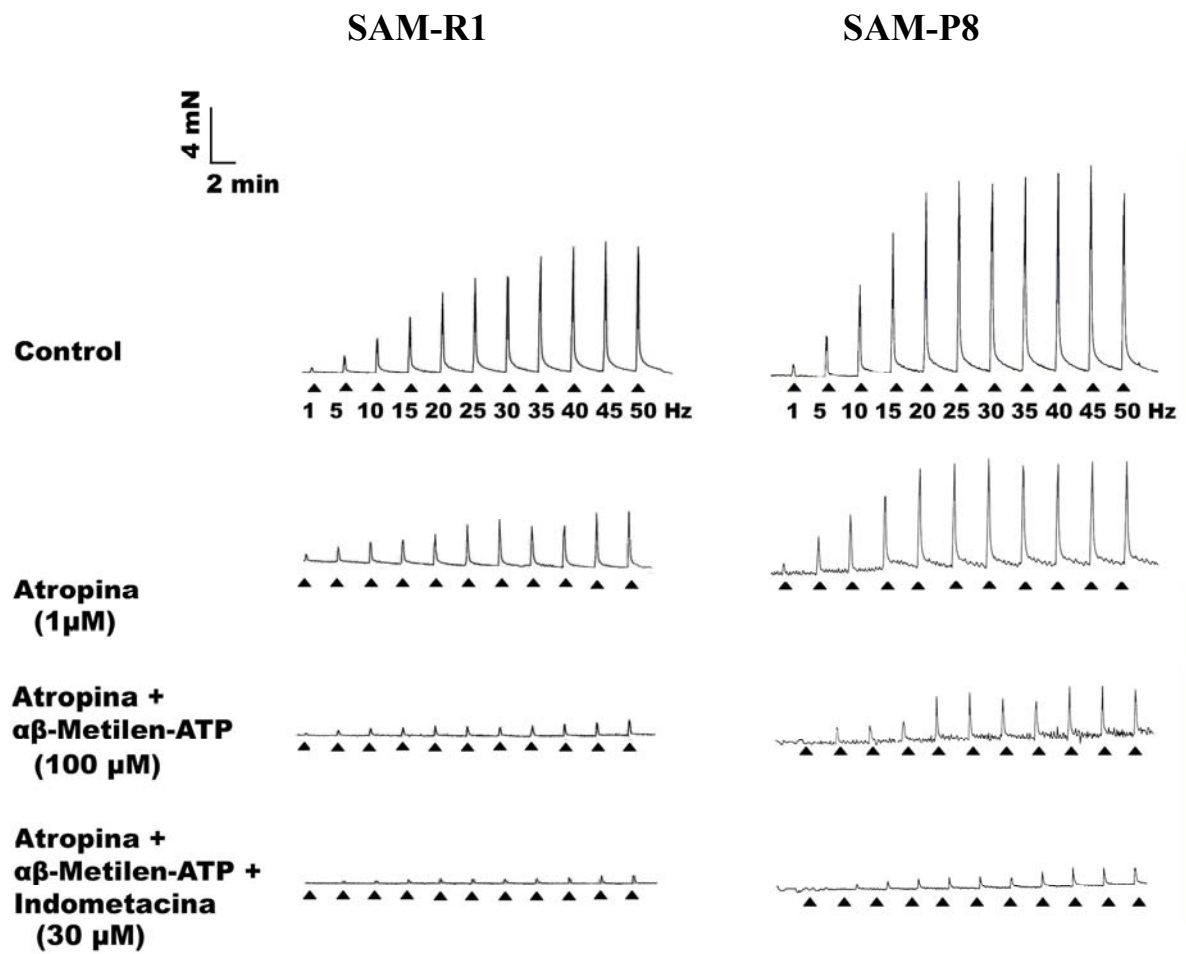


Figura 10. Registros representativos de la respuesta contráctil inducida por EFS (1-50 Hz) en tiras longitudinales de músculo liso de vejiga hembra SAM-R1 y SAM-P8 en condiciones control y en presencia de diferentes inhibidores.

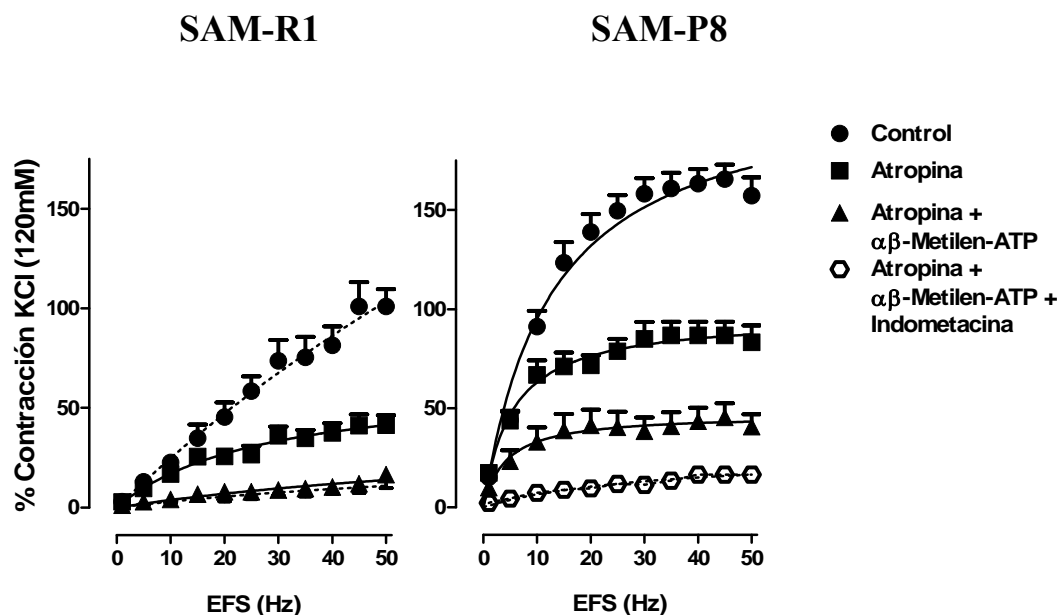


Figura 11. Curvas frecuencia-respuesta que muestran el efecto de la preincubación con Atropina (1 μ M), Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (100 μ M), y Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina (30 μ M) sobre la contracción inducida por EFS (1-50 Hz), en preparaciones longitudinales de músculo liso vesical de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 6-14$).

	SAM-R1		SAM-P8	
	EF ₅₀	E _{max}	EF ₅₀	E _{max}
Control	20,5 \pm 1,2	101,0 \pm 12,0 (45Hz)	10,2 \pm 1,6 ***	165,7 \pm 7,3 *** (45Hz)
Atropina (1 μ M)	16,7 \pm 1,4	41,4 \pm 4,9 ^{###} (45Hz)	7,3 \pm 0,7 ***	86,7 \pm 6,9 *** ^{###} (45Hz)
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (100 μ M)	19,9 \pm 2,4	16,6 \pm 2,6 ^{ΦΦ} (50Hz)	6,2 \pm 0,7 ***	45,4 \pm 7,2 *** ^{ΦΦΦ} (50Hz)
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina (30 μ M)	16,7 \pm 2,4	12 \pm 2,18 (50Hz)	14,2 \pm 2,4	17,1 \pm 1,7 ^Δ (50Hz)

Tabla 2. Valores de potencia (EF₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) obtenidos de la relación frecuencia-respuesta en preparaciones longitudinales de músculo liso vesical de hembras SAM-R1 y SAM-P8 en condiciones control y en presencia de diferentes inhibidores ($n = 6-14$). *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1, ^{###} $p < 0,001$ diferencias respecto a la respuesta control, ^{ΦΦ} $p < 0,01$, ^{ΦΦΦ} $p < 0,001$ diferencias respecto a la respuesta inhibida con atropina y ^Δ $p < 0,05$ diferencias respecto a la respuesta inhibida con atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP.

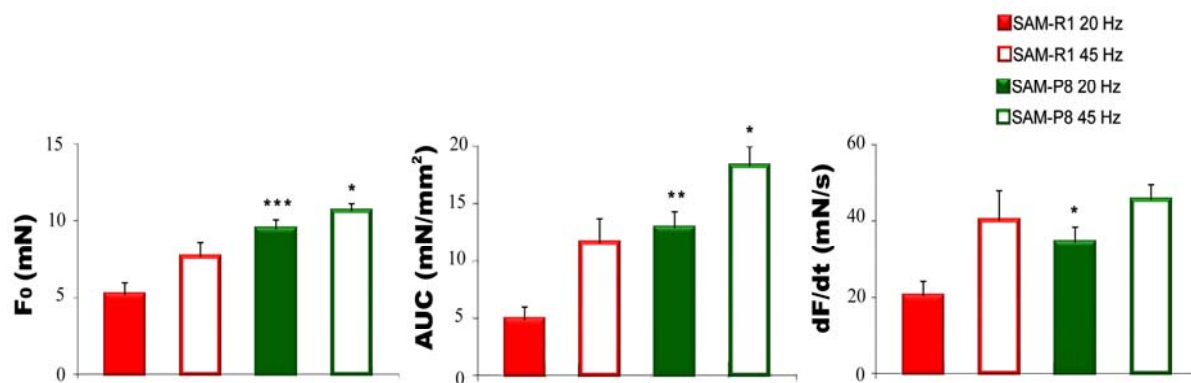


Figura 12. Amplitud (F_0), área bajo la curva (AUC) y velocidad de contracción (dF/dt) de la respuesta máxima (45 Hz) y media (20 Hz) inducidas por EFS en preparaciones vesicales de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 6-10$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

	SAM-R1			SAM-P8		
EFS 20 Hz	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)
Control	$5,2 \pm 0,7$	$4,9 \pm 1,1$	$20,2 \pm 3,9$	$9,4 \pm 0,6$ ***	$12,9 \pm 1,4$ **	$34,4 \pm 3,9$ *
Atropina	$2,8 \pm 0,3$ #	$2,3 \pm 0,4$ #	$10,1 \pm 1,6$ #	$5,0 \pm 0,3$ ***###	$7,0 \pm 0,9$ #	$22,8 \pm 3,4$ ***###
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP	$1,1 \pm 0,3$ $\Phi\Phi\Phi$	$1,2 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,7$ Φ	$2,2 \pm 0,4$ * $\Phi\Phi$	$2,8 \pm 0,4$ * Φ	$11,1 \pm 2,2$ * Φ
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina	$0,7 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,1$ $\Delta \Delta$	$0,7 \pm 0,3$ $\Delta \Delta$	$4,3 \pm 1,0$ Δ

	SAM-R1			SAM-P8		
EFS 45 Hz	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)
Control	$7,6 \pm 0,9$	$11,6 \pm 2,1$	$40,1 \pm 7,8$	$10,6 \pm 0,5$ *	$18,2 \pm 1,8$ *	$45,4 \pm 3,9$
Atropina	$3,5 \pm 0,5$ ###	$5,3 \pm 0,9$ #	$25,3 \pm 3,7$	$5,9 \pm 0,6$ *###	$9,0 \pm 1,4$ *###	$29,6 \pm 3,4$ #
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP	$1,6 \pm 0,3$ $\Phi\Phi\Phi$	$2,3 \pm 0,6$ Φ	$5,8 \pm 1,4$ $\Phi\Phi$	$2,7 \pm 0,6$ $\Phi\Phi$	$3,1 \pm 0,4$ $\Phi\Phi\Phi$	$10,2 \pm 1,3$ $\Phi\Phi\Phi$
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina	$1,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,5$	$5,2 \pm 1,1$	$0,9 \pm 0,2$ Δ	$1,0 \pm 0,4$ $\Delta \Delta$	$5,1 \pm 1,2$ Δ

Tabla 3. Valores de F_0 , AUC y dF/dt de la respuesta máxima (45 Hz) y media (20 Hz) inducidas por EFS en preparaciones vesicales de hembras SAM-R1 y SAM-P8 y efecto de los distintos tratamientos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 6-10$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ respecto a la respuesta control; Φ $p < 0,05$, $\Phi\Phi$ $p < 0,01$ y $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0,001$ respecto a la respuesta inhibida con atropina y Δ $p < 0,05$, $\Delta\Delta$ $p < 0,01$ diferencias respecto a la respuesta inhibida con atropina y $\alpha\beta$ -Metilen-ATP.

4.2.3.2. Machos

a) Respuesta contráctil inducida por EFS en la vejiga de ratones macho

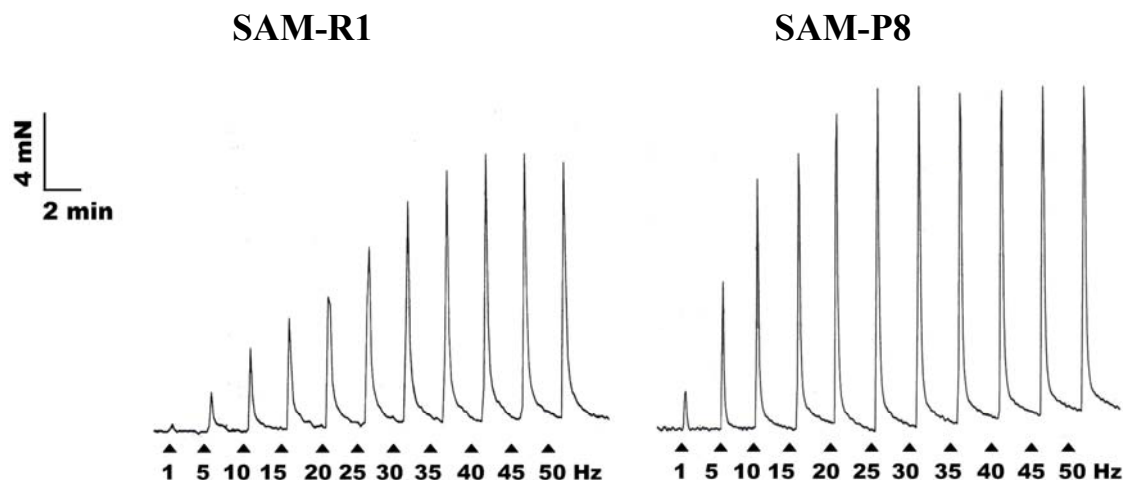


Figura 13. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por EFS en preparaciones longitudinales de músculo liso de vejiga macho SAM-R1 y SAM-P8.

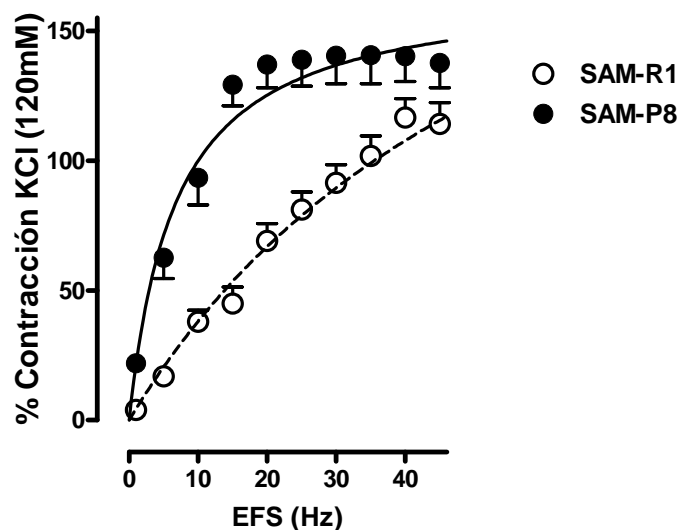


Figura 14. Curva frecuencia-respuesta inducida por EFS (1-45 Hz) en preparaciones longitudinales de músculo liso de vejiga de machos SAM-P8 y SAM-R1. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 12-18$).

SAM-R1			SAM-P8		
EF ₅₀	E _{max} (40 Hz)	n	EF ₅₀	E _{max} (25 Hz)	n
18,5 \pm 1,1	114,2 \pm 8,2	12	7,5 \pm 0,8 ***	141,9 \pm 10,7 *	18

Tabla 4. Valores de la potencia (EF₅₀) y de la respuesta máxima (E_{max}) de las curvas frecuencia-respuesta inducidas por EFS (1-45 Hz) en preparaciones longitudinales de músculo liso de vejiga de machos SAM-R1 y SAM-P8. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

b) Mediadores implicados

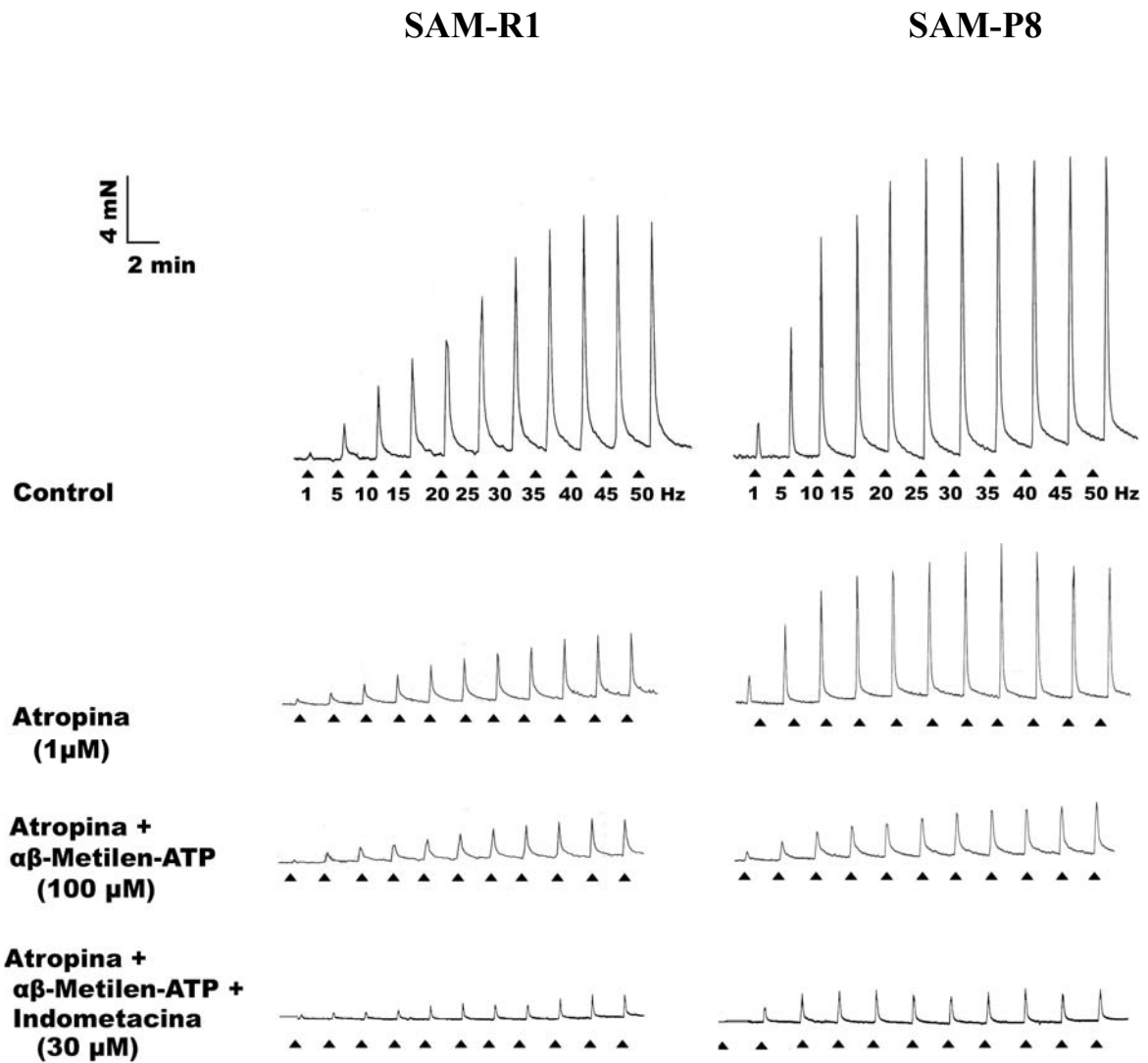


Figura 15. Registros representativos de la respuesta contráctil inducida por EFS (1-50 Hz) en tiras longitudinales de músculo liso de vejiga macho SAM-P8 y SAM-R1 en condiciones control y en presencia de diferentes inhibidores.

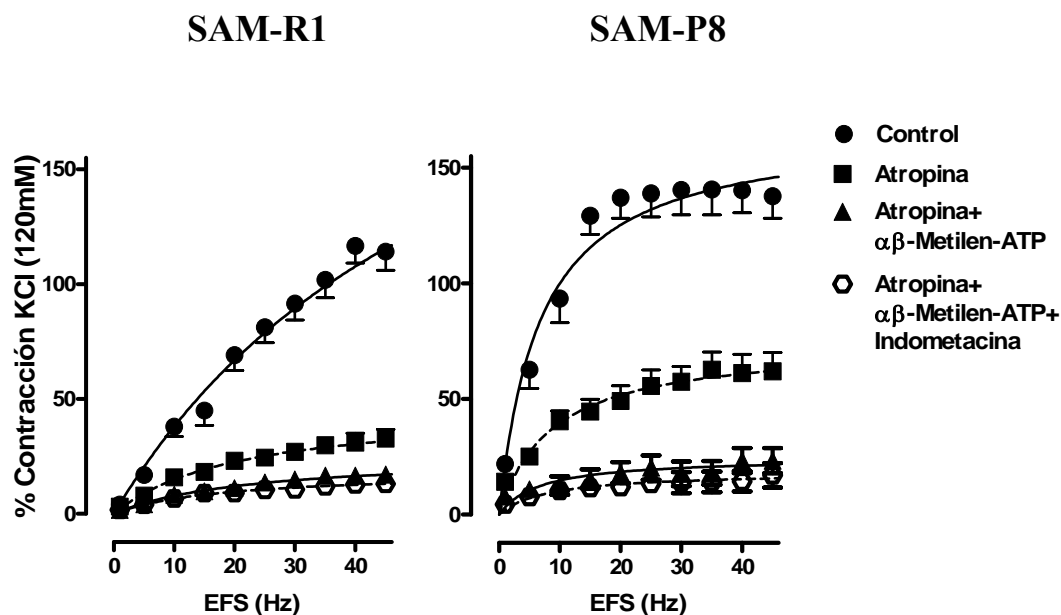


Figura 16. Curvas frecuencia-respuesta que muestran el efecto de la preincubación con Atropina (1 μ M), Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (100 μ M), y Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina (30 μ M) sobre la contracción inducida por EFS (1-45 Hz), en preparaciones longitudinales de músculo liso vesical de machos SAM-P8 y SAM-R1. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 5-18$).

	SAM-R1		SAM-P8	
	EF ₅₀	E _{max}	EF ₅₀	E _{max}
Control	18,5 \pm 1,1	114,2 \pm 8,2 (40 Hz)	7,5 \pm 0,8 ***	141,9 \pm 10,7 * (25 Hz)
Atropina (1 μ M)	12,7 \pm 1,2 ##	32,7 \pm 4,0 ### (40 Hz)	6,2 \pm 0,7 ***	62,6 \pm 7,9 ** ### (40 Hz)
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP (100 μ M)	13,1 \pm 2,3	16,7 \pm 2,2 Φ (40 Hz)	9,1 \pm 1,6	23,7 \pm 5,5 $\Phi\Phi$ (40 Hz)
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina (30 μ M)	13,0 \pm 1,0	12,1 \pm 2,0 (40 Hz)	11,6 \pm 2,3	18,0 \pm 4,9 (40 Hz)

Tabla 5. Valores de potencia (EF₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) obtenidos de la relación frecuencia-respuesta en preparaciones longitudinales de músculo liso vesical de machos SAM-R1 y SAM-P8 en condiciones control y en presencia de diferentes inhibidores ($n = 5-18$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1; ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ respecto a la respuesta control y $\Phi p < 0,05$ y $\Phi\Phi p < 0,01$ respecto a la respuesta inhibida con atropina.

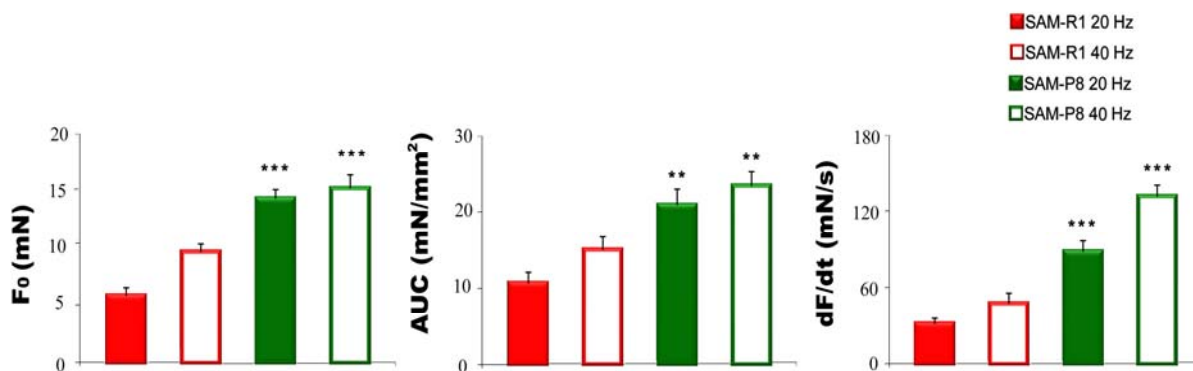


Figura 17. Amplitud (F_0), área bajo la curva (AUC) y velocidad de contracción (dF/dt) de las contracciones inducidas por EFS en la respuesta máxima (40 Hz) y media (20 Hz) en preparaciones vesicales de machos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 5-18$). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

EFS 20 Hz	SAM-R1			SAM-P8		
	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)
Control	$5,9 \pm 0,7$	$10,6 \pm 1,5$	$31,7 \pm 4,8$	$14,4 \pm 0,8^{***}$	$20,9 \pm 2,1^{**}$	$89,3 \pm 8,9^{***}$
Atropina	$2,2 \pm 0,5^{##}$	$3,4 \pm 0,7^{##}$	$9,6 \pm 1,3^{##}$	$5,4 \pm 1,0^{*###}$	$7,0 \pm 1,0^{*###}$	$41,4 \pm 6,9^{*##}$
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP	$1,1 \pm 0,1^{\Phi}$	$1,0 \pm 0,4^{\Phi}$	$3,6 \pm 1,3^{\Phi}$	$1,9 \pm 0,5^{\Phi\Phi}$	$2,6 \pm 0,6^{\Phi\Phi}$	$14,9 \pm 5,0^{\Phi}$
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,5$	$6,1 \pm 1,3$

EFS 40 Hz	SAM-R1			SAM-P8		
	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)	F_0 (mN)	AUC (mN/mm ²)	dF/dt (mN/s)
Control	$9,7 \pm 0,7$	$15,0 \pm 1,7$	$48,3 \pm 8,3$	$15,3 \pm 1,2^{***}$	$23,4 \pm 1,9^{**}$	$133,6 \pm 9,3^{***}$
Atropina	$3,0 \pm 0,6^{###}$	$6,5 \pm 1,1^{##}$	$16,9 \pm 2,7^{##}$	$7,1 \pm 1,3^{*###}$	$7,3 \pm 1,0^{###}$	$46,9 \pm 7,1^{*###}$
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP	$1,3 \pm 0,2^{\Phi}$	$2,3 \pm 0,9^{\Phi}$	$5,2 \pm 1,8^{\Phi}$	$3,4 \pm 0,9^{\Phi}$	$3,3 \pm 0,8^{\Phi}$	$19,8 \pm 5,6^{*\Phi\Phi}$
Atropina + $\alpha\beta$ -Metilen-ATP + Indometacina	$0,9 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,6$	$13,4 \pm 2,9^{*}$

Tabla 6. Valores de F_0 , AUC y dF/dt de la respuesta máxima (40 Hz) y media (20 Hz) inducidas por EFS en preparaciones vesicales de machos SAM-R1 y SAM-P8 y efecto de los distintos tratamientos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 5-18$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1; ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ señala diferencias respecto a la respuesta control y $^{\Phi}p < 0,05$, $^{\Phi\Phi}p < 0,01$ respecto a la respuesta inhibida con atropina.

4.2.4. Diferencias en la contractilidad vesical inducida por ACh y ATP exógeno

a) Hembras

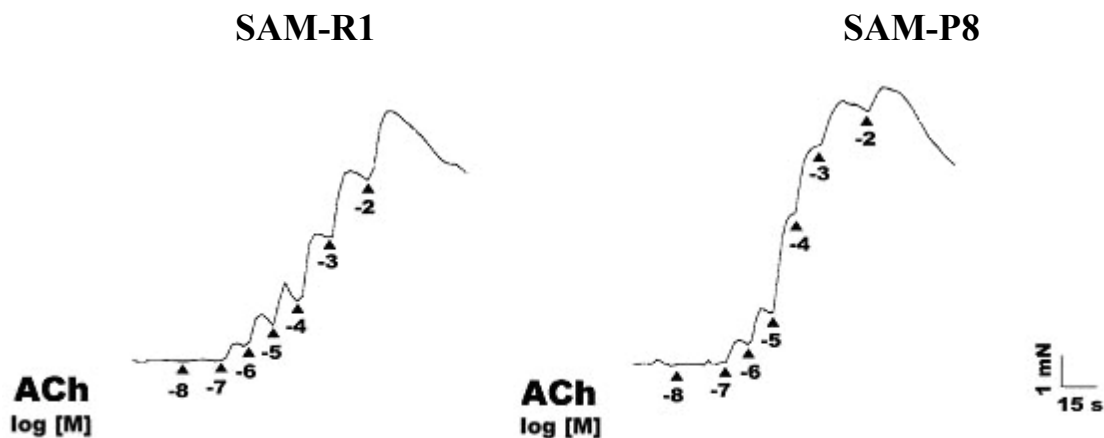


Figura 18. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por la adición exógena acumulativa de ACh en tiras longitudinales de músculo liso de vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

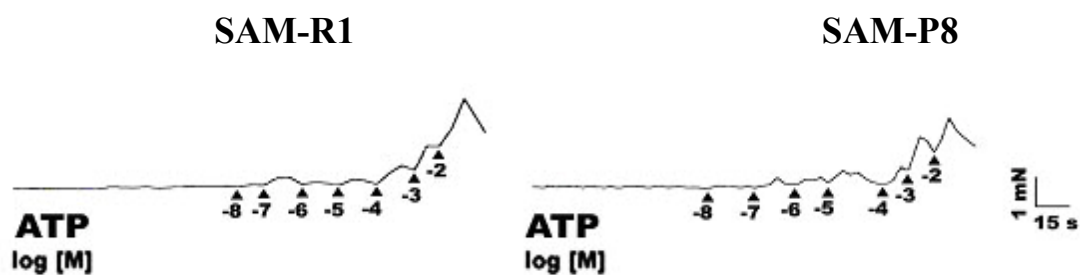


Figura 19. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por la adición exógena acumulativa de ATP en tiras longitudinales de músculo liso de vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

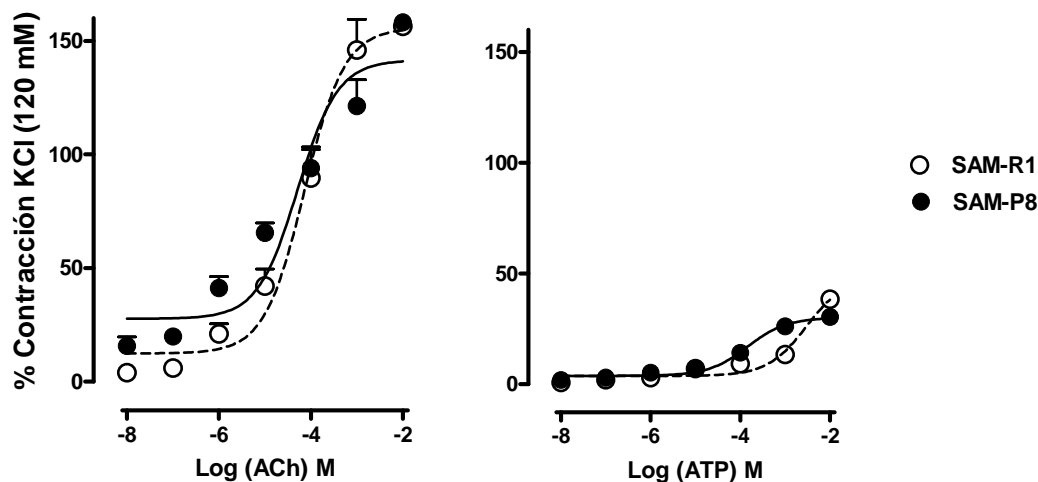


Figura 20. Curva dosis-respuesta acumulativa (10^{-8} M a 10^{-2} M) inducida por ACh y ATP en preparaciones de vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=14-17$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	n
ACh	4,1 \pm 0,2	156,4 \pm 13,5	14	4,3 \pm 0,2	158,1 \pm 10,5	17
ATP	2,9 \pm 0,4	38,4 \pm 3,7	14	3,9 \pm 0,2 *	30,3 \pm 1,6 *	17

Tabla 7. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de las curvas dosis-respuesta acumulativas inducidas por ACh y ATP en preparaciones de vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($n=14-17$). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

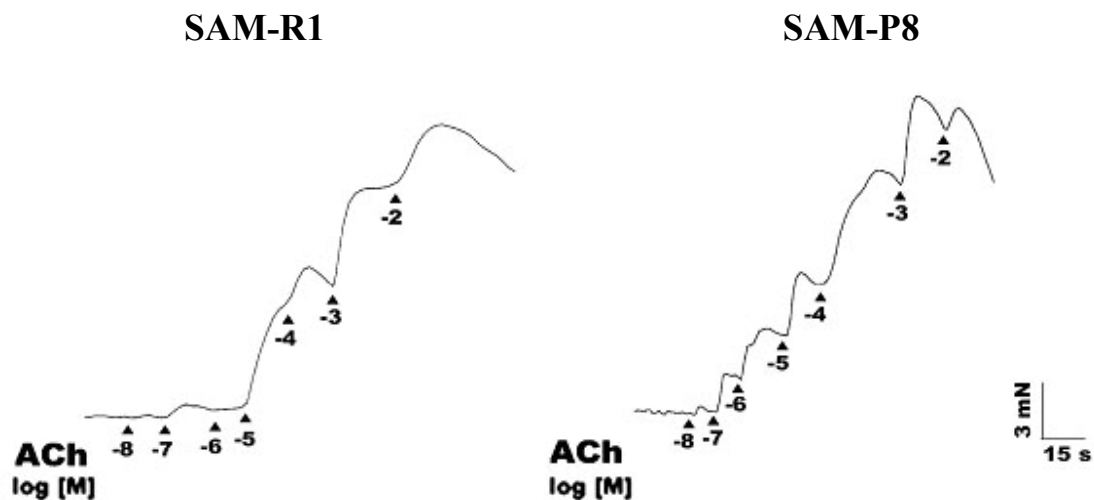
b) Machos


Figura 21. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por la adición exógena acumulativa de ACh en tiras longitudinales de músculo liso de vejiga macho SAM-R1 y SAM-P8. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

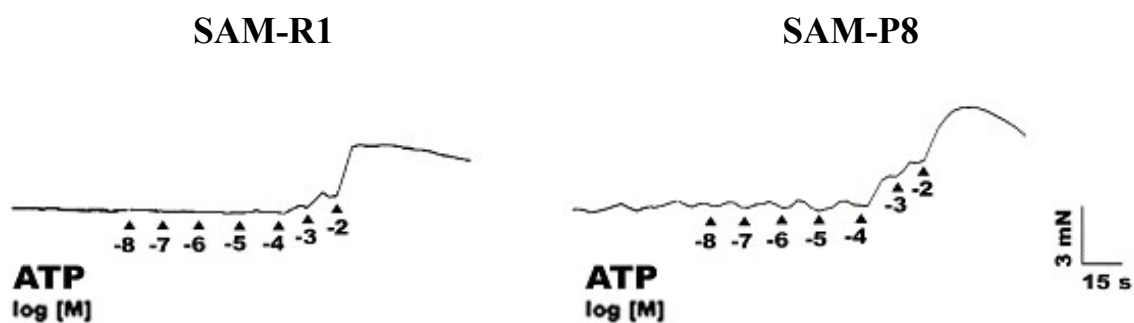


Figura 22. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por la adición exógena acumulativa de ATP en tiras longitudinales de músculo liso de vejiga macho SAM-R1 y SAM-P8. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

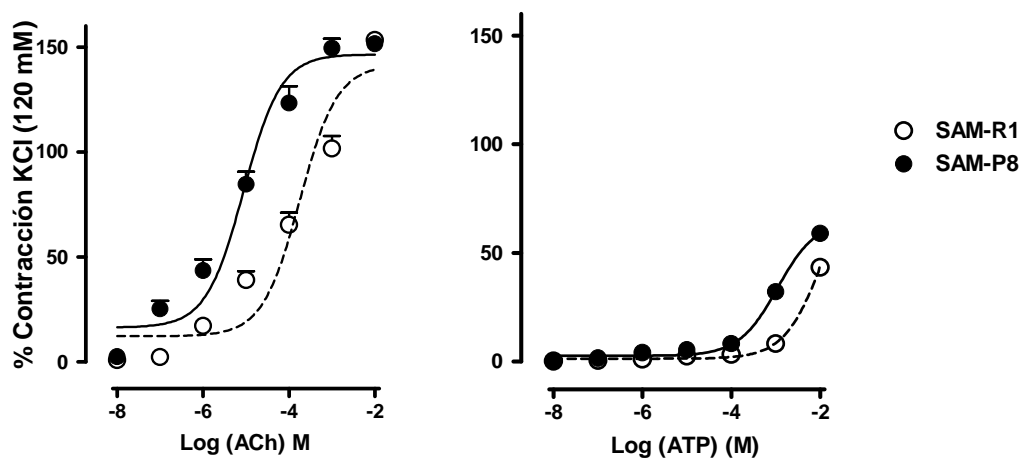


Figura 23. Curva dosis-respuesta acumulativa (10^{-8} M a 10^{-2} M) inducida por ACh y ATP en preparaciones vesicales de machos SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n= 7-19$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	n
ACh	3,8 \pm 0,2	153,3 \pm 2,5	10	5,2 \pm 0,2 **	151,6 \pm 2,7	19
ATP	2,6 \pm 0,2	43,4 \pm 0,8	7	3,2 \pm 0,2 ***	59,0 \pm 1,3 ***	13

Tabla 8. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de las curvas dosis-respuesta acumulativas inducidas por ACh y ATP en preparaciones de vejiga de machos SAM-R1 y SAM-P8. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($n= 7-19$). **p<0,01 y ***p<0,001 señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

4.2.5. Cambios en la densidad de inervación vesical

4.2.5.1. Inervación colinérgica

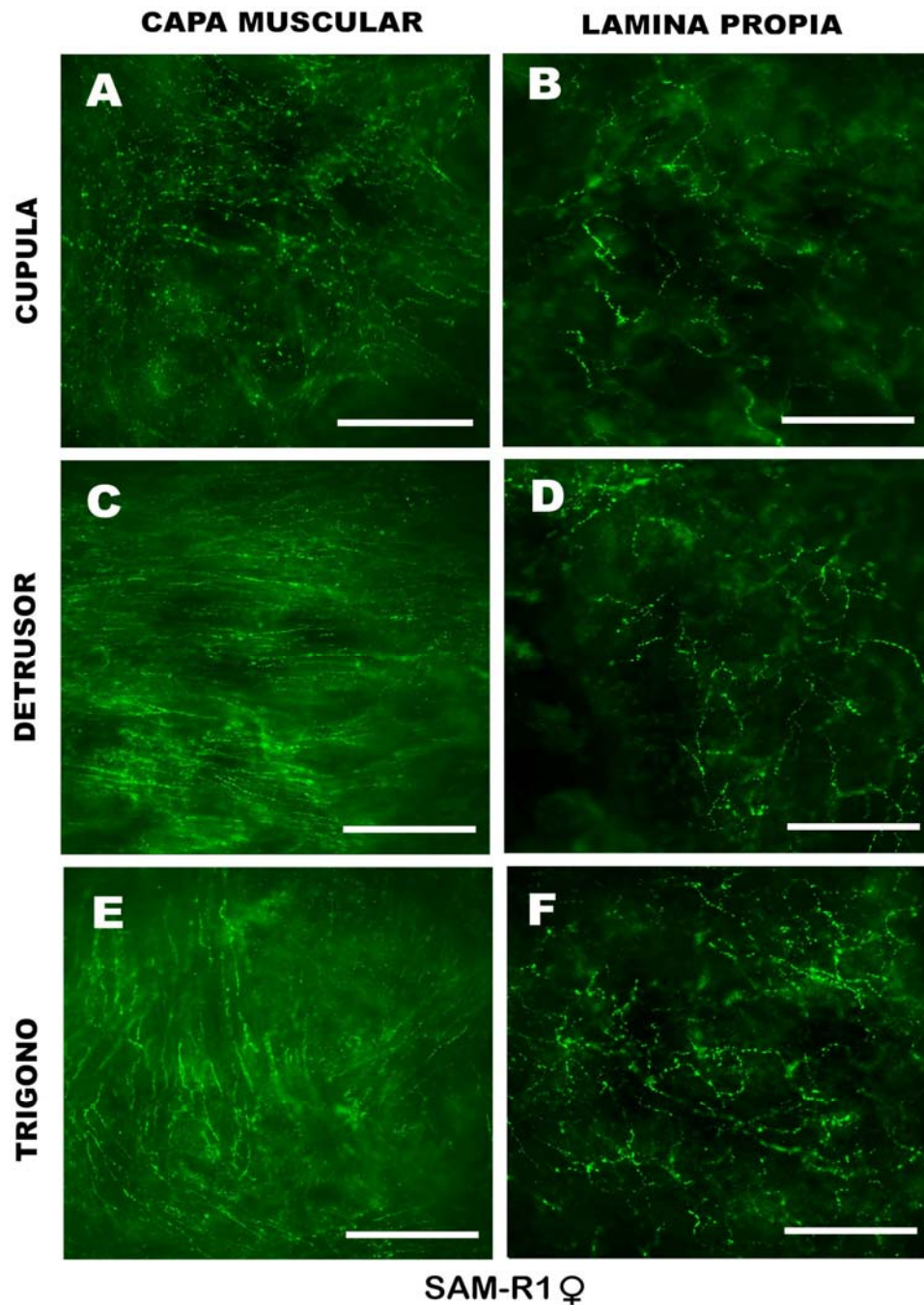


Figura 24. Inmunorreactividad a VACHT en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (*A, C, E*) y lámina propia (*B, D, F*) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-R1: cúpula (*A, B*), detrusor (*C, D*) y trigono (*E, F*). En la lámina propia se observa una mayor densidad de nervios colinérgicos en el trigono, mientras que en el músculo aparece una densa red colinérgica uniforme en toda la vejiga. Barra =100 μ m.

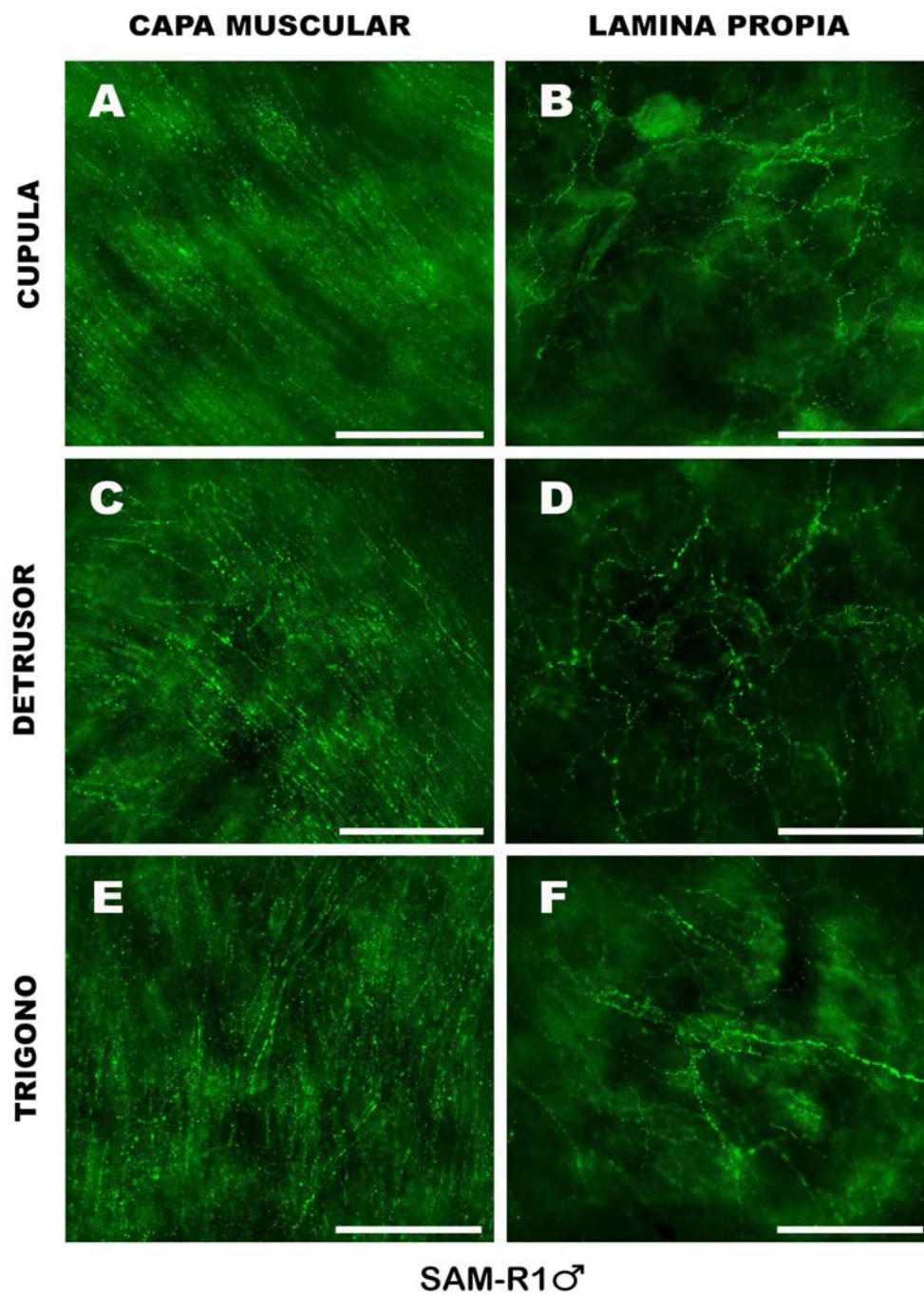


Figura 25. Inmunorreactividad a VAcHT en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-R1: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). Se observa una distribución uniforme de la innervación colinérgica tanto en la capa muscular como en la lámina propia. Puede apreciarse como las fibras nerviosas de la capa muscular siguen el curso de los haces musculares y en la lámina propia rodean los vasos sanguíneos. Barra= 100 μ m.

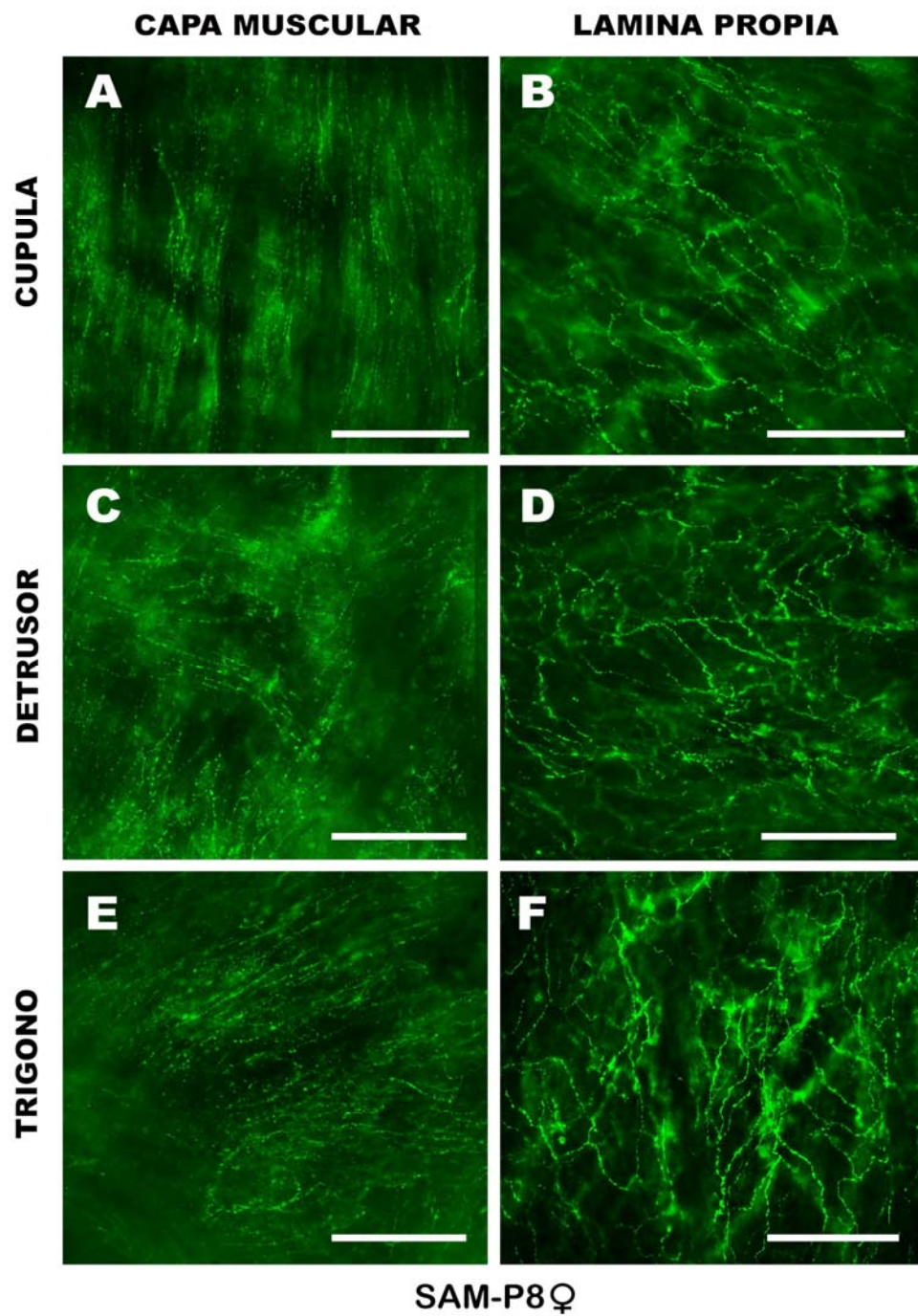


Figura 26. Inmunorreactividad a VAcHT en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (*A*, *C*, *E*) y lámina propia (*B*, *D*, *F*) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-P8: cúpula (*A*, *B*), detrusor (*C*, *D*) y trigono (*E*, *F*). Destaca el aumento aparente de innervación colinérgica en la lámina propia vesical con respecto a SAM-R1. Barra= 100 μ m.

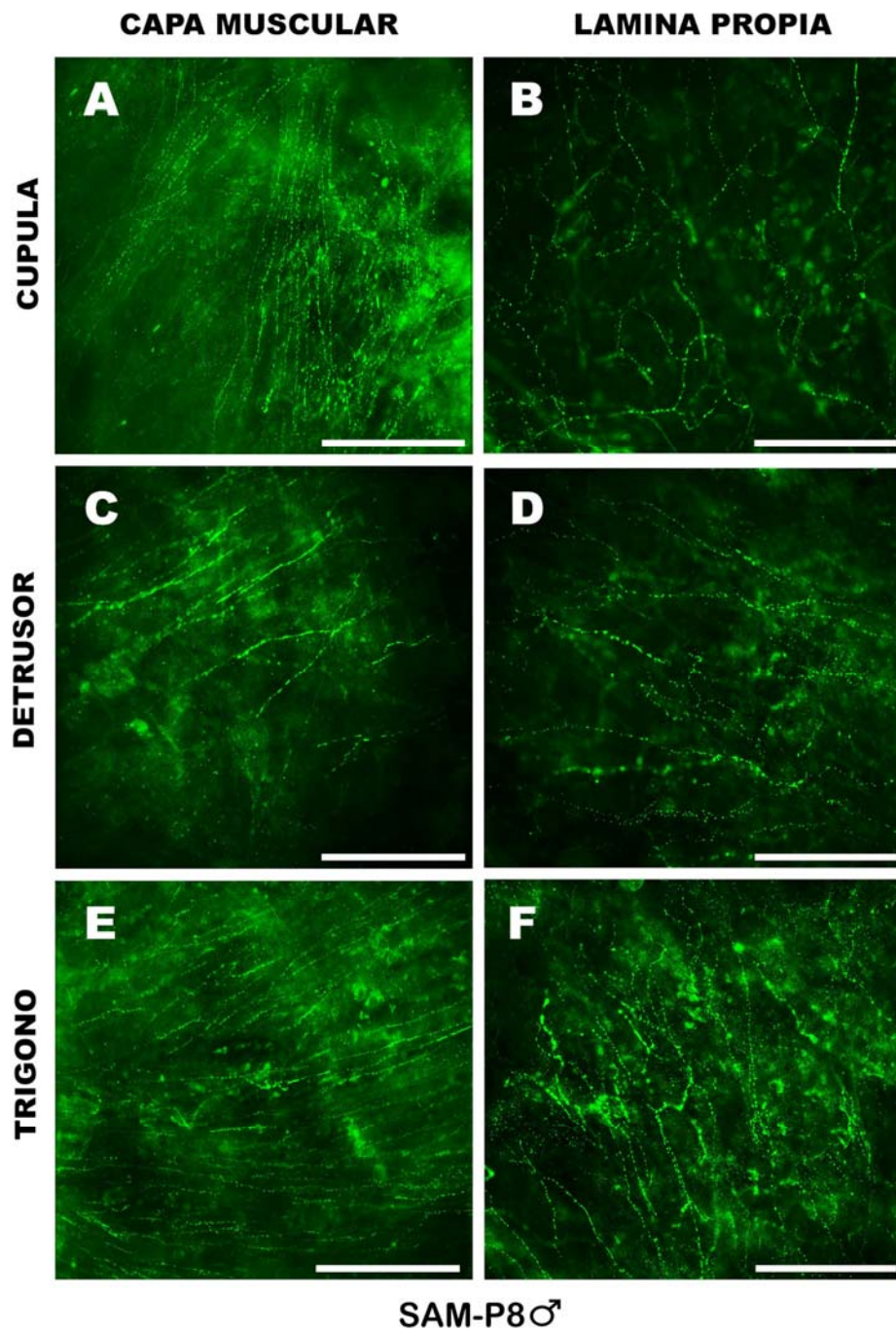


Figura 27. Inmunorreactividad a VAcHT en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-P8: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). Se puede observar un aumento en la densidad de innervación en la zona del trigono de la lámina propia con respecto a SAM-R1. Barra= 100 μ m.

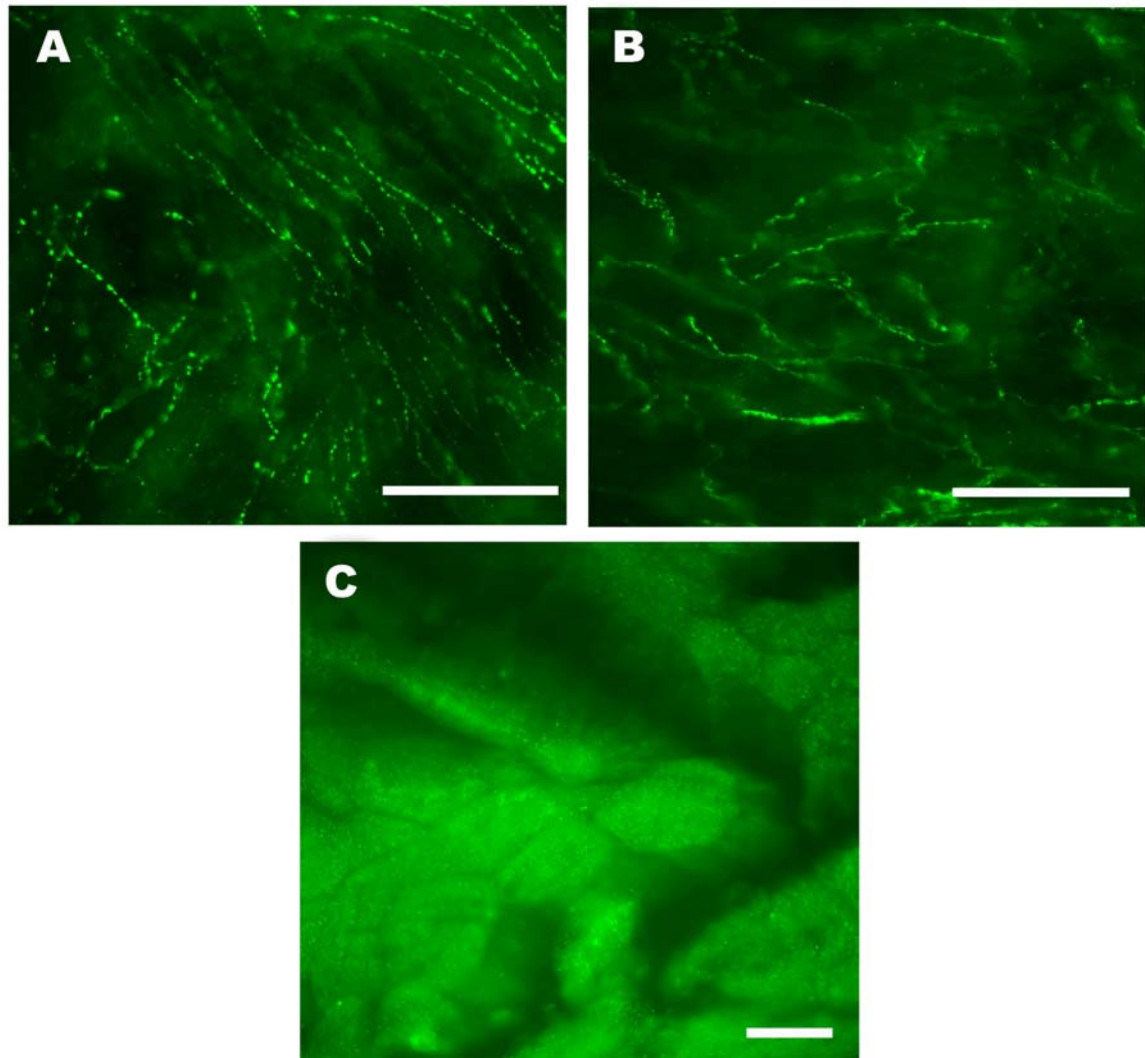


Figura 28. Detalle de estructuras inmunorreactivas a VACHT en vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Inervación colinérgica en detrusor SAM-R1 (**A**) y en lámina propia de trigono SAM-P8 (**B**), observándose numerosas varicosidades nerviosas. **C.** Epitelio inmunorreactivo a VACHT en SAM-R1. Barra= 50 μ m.

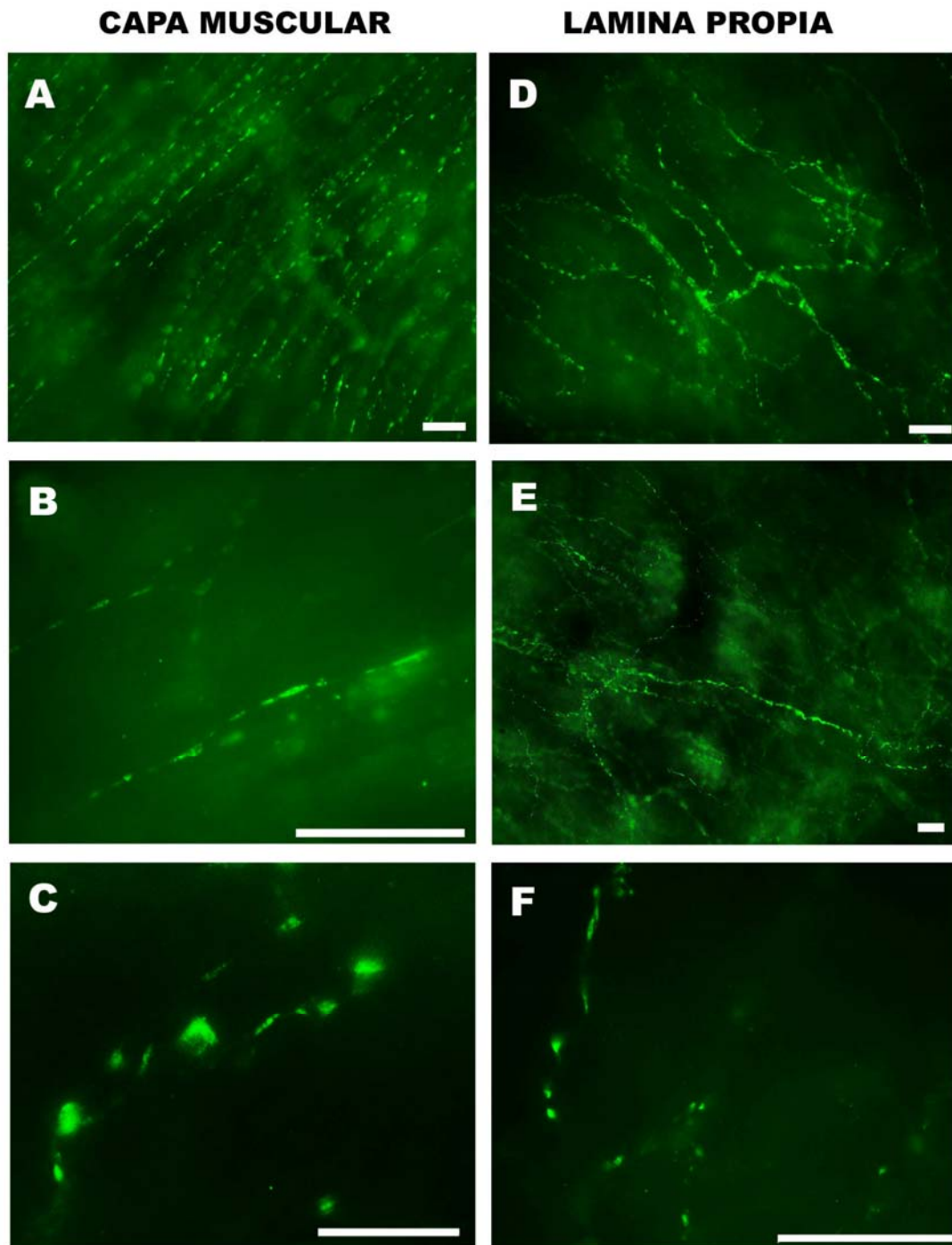


Figura 29. Detalle de estructuras inmunorreactivas a VACHT en vejiga de machos SAM-R1 y SAM-P8. Detrusor de SAM-P8: **A**: Terminaciones nerviosas finas; **B** y **C**: Varicosidades de las terminaciones nerviosas a mayores aumentos. Trígono (lámina propia) SAM-R1: **D**: Terminaciones nerviosas; **E**: inervación perivascular; **F**: Varicosidades de las terminaciones nerviosas a mayores aumentos. Barra= 12 μ m (**A**, **B**, **D**, **E** y **F**) y 6 μ m (**C**).

VEJIGA SAM-R1

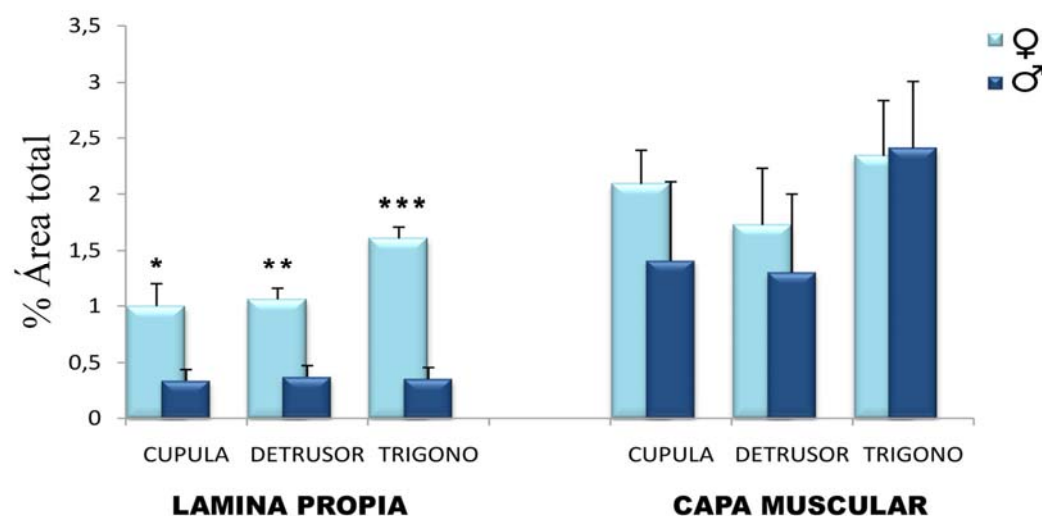


Figura 30. Diferencias entre el macho y la hembra en la inmunorreactividad a VACHT en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-R1. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

VEJIGA ♀

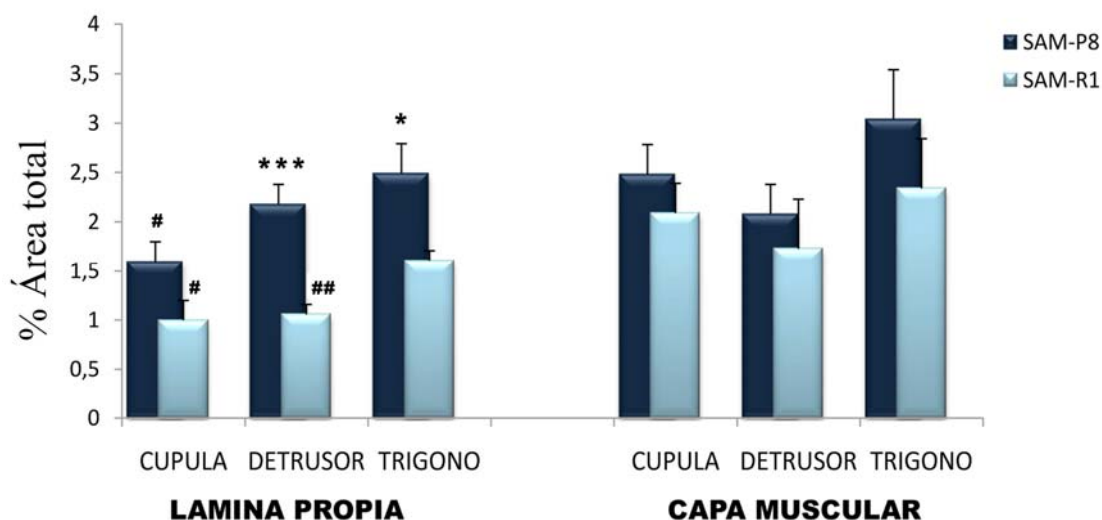


Figura 31. Cuantificación de la inmunorreactividad a VACHT en diferentes regiones vesicales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). * $p<0,05$ y *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y # $p<0,05$ y ## $p<0,01$ diferencias respecto al trigono.

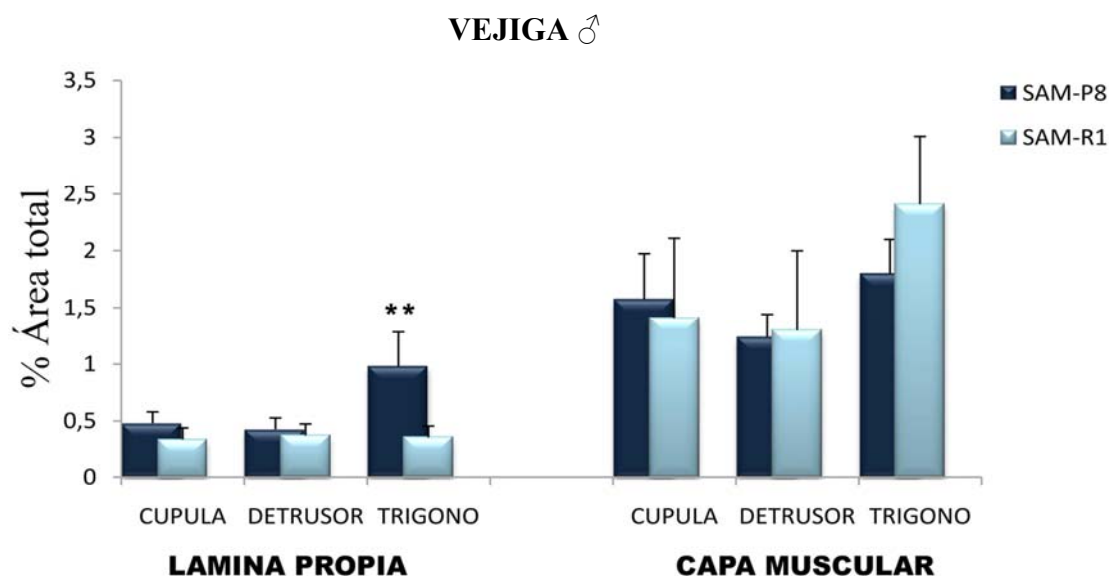


Figura 32. Cuantificación de la inmunorreactividad a VACHT en diferentes regiones vesicales de ratones macho SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). ** $p<0,01$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

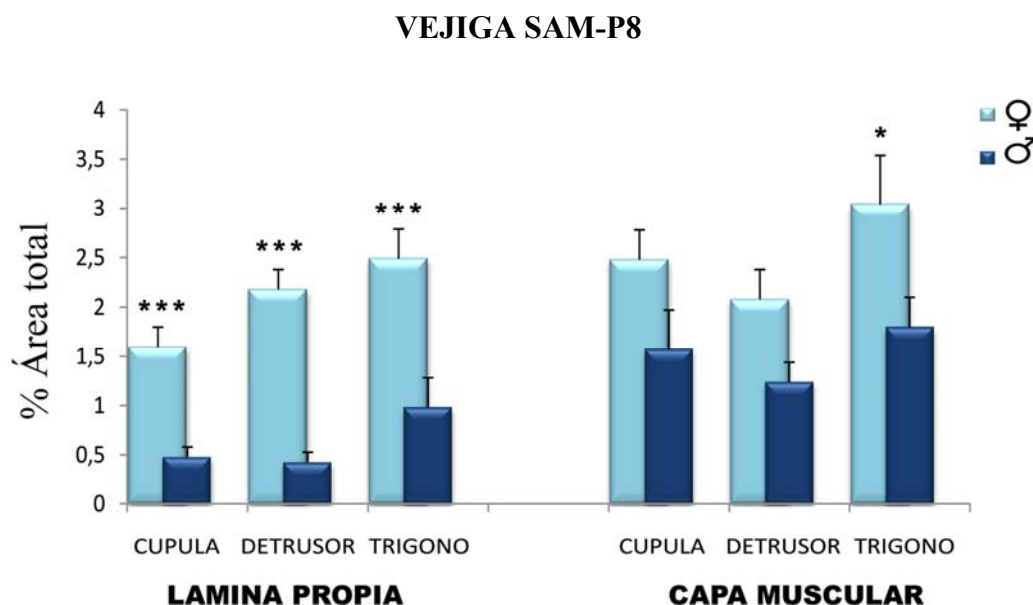


Figura 33. Diferencias entre el macho y la hembra en la inmunorreactividad a VACHT en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). * $p<0,05$ y *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

4.2.5.2. Inervación nitrérgica

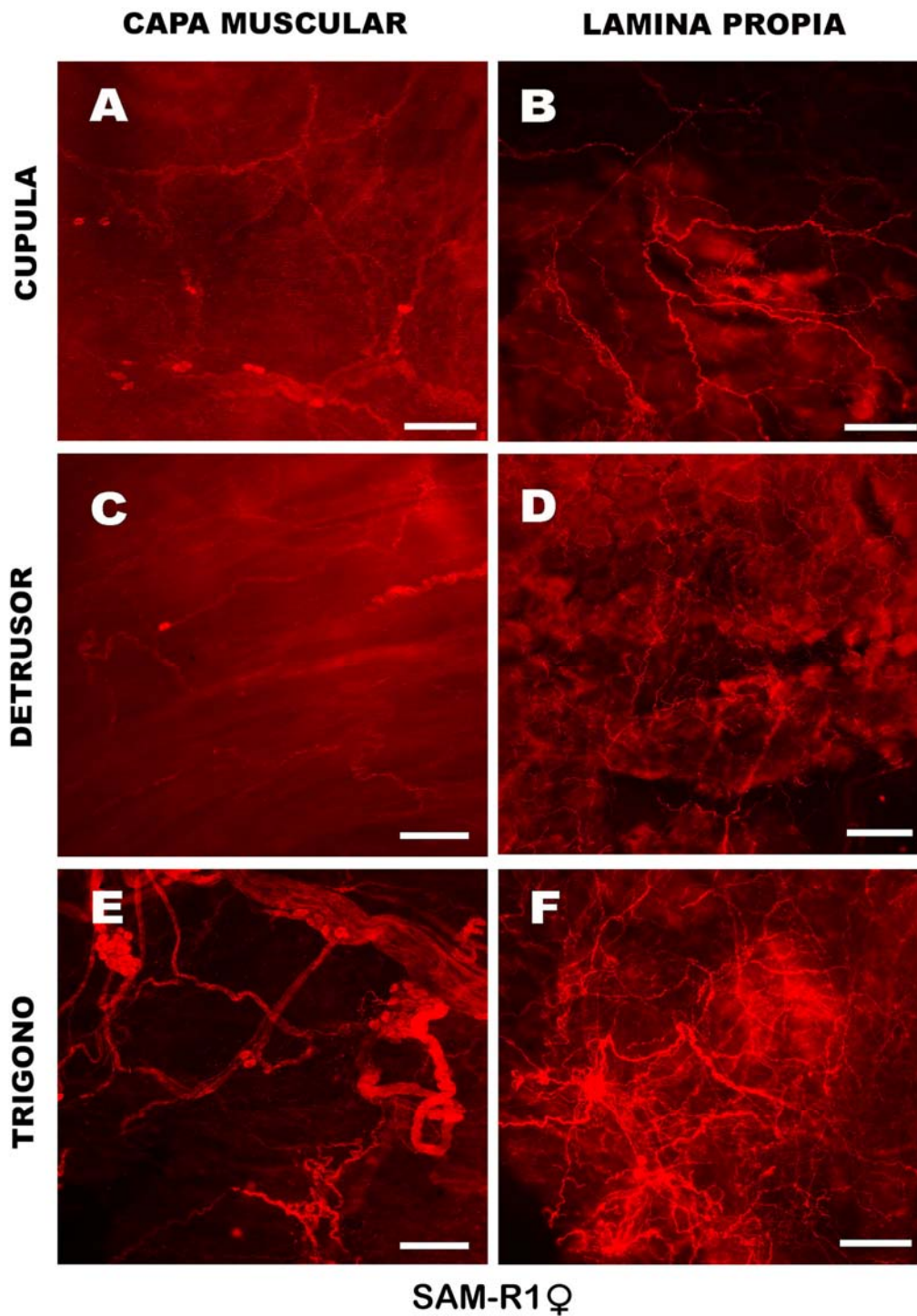


Figura 34. Inmunorreactividad a nNOS en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-R1: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). Se observa una mayor densidad de inervación nitrérgica en el trigono. Nótese la abundancia de ganglios intramurales y troncos nerviosos en la capa muscular. Barra= 100 μ m.

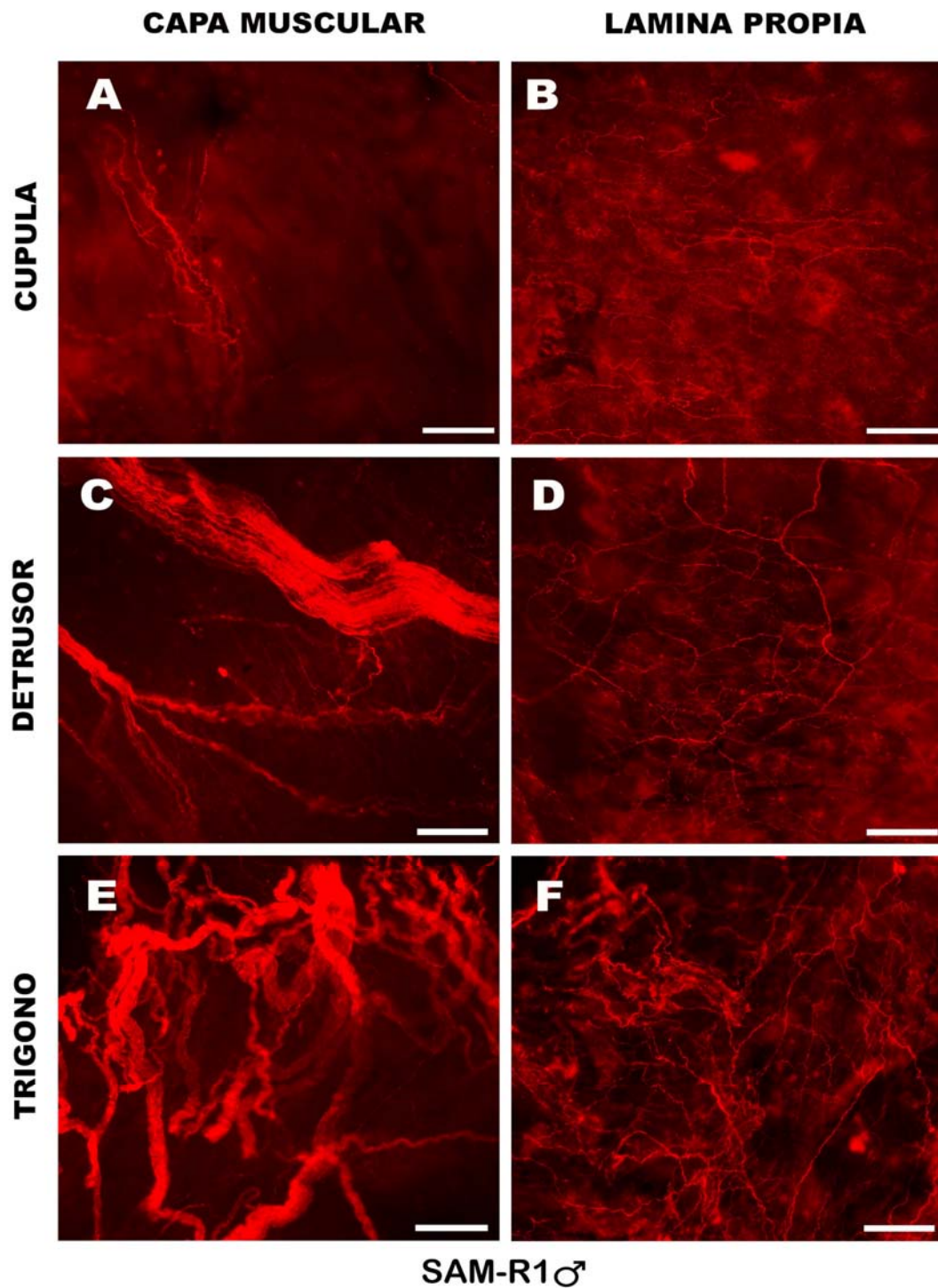


Figura 35. Inmunorreactividad a nNOS en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (*A*, *C*, *E*) y lámina propia (*B*, *D*, *F*) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-R1: cúpula (*A*, *B*), detrusor (*C*, *D*) y trigono (*E*, *F*). Se puede apreciar un aumento de la densidad nitrérgica al desplazarnos desde la cúpula al trigono, tanto en capa muscular como en lámina propia. Destacan los numerosos troncos nerviosos y ganglios en el trigono de la capa muscular. Barra= 100 μ m.

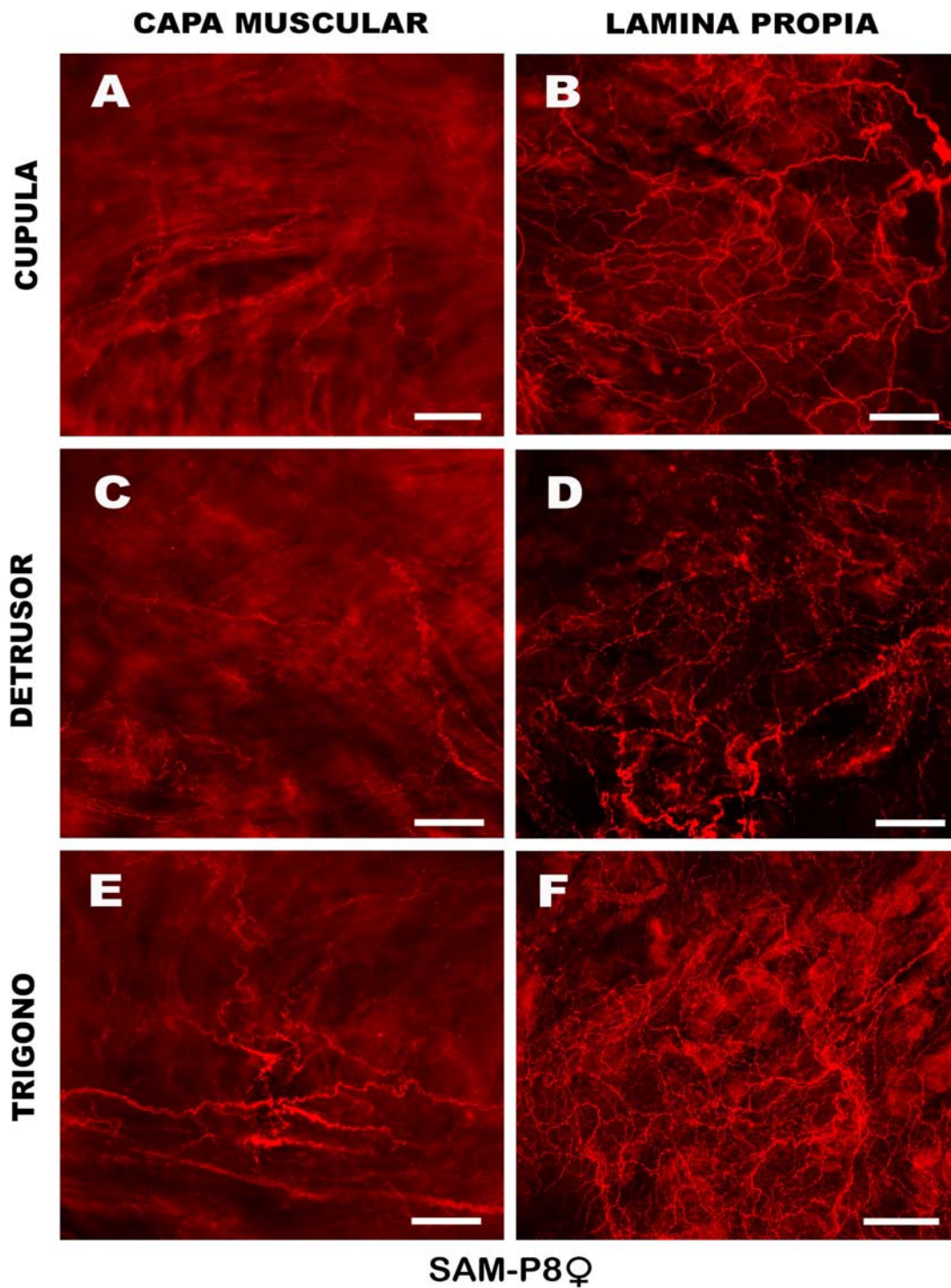


Figura 36. Inmunorreactividad a nNOS en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (*A, C, E*) y lámina propia (*B, D, F*) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-P8: cúpula (*A, B*), detrusor (*C, D*) y trigono (*E, F*). Puede observarse un aumento considerable de densidad nitrérgica en la lámina propia con respecto a SAM-R1. Barra= 100 μ m.

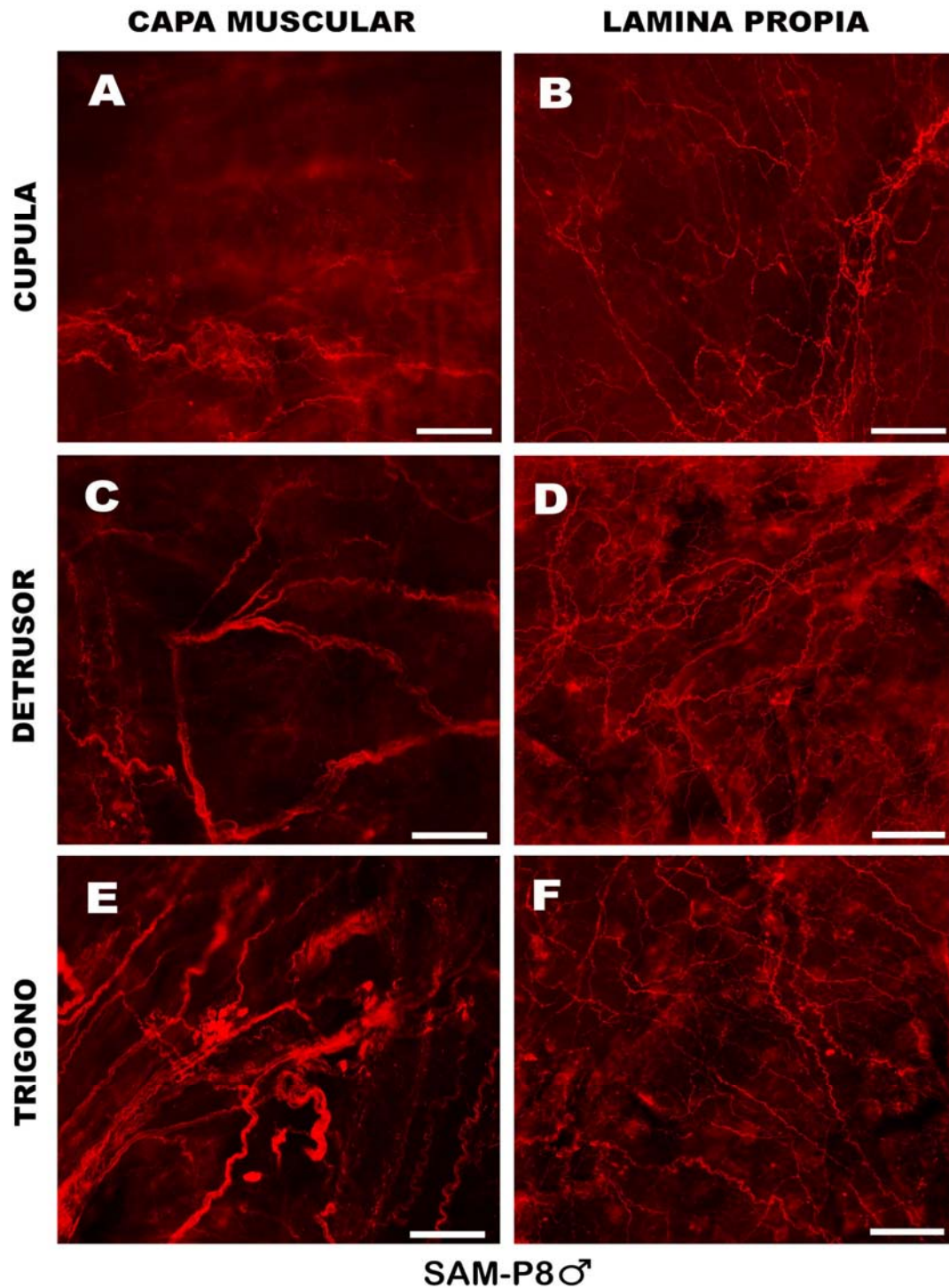


Figura 37. Inmunorreactividad a nNOS en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (*A*, *C*, *E*) y lámina propia (*B*, *D*, *F*) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-P8: cúpula (*A*, *B*), detrusor (*C*, *D*) y trigono (*E*, *F*). Se observa que mientras la densidad de innervación en la lámina propia del detrusor aumenta respecto a SAM-R1, en la capa muscular de la misma región ésta disminuye ligeramente. Destacan igualmente numerosos troncos y ganglios nerviosos en la capa muscular del trigono. Barra= 100 μ m.

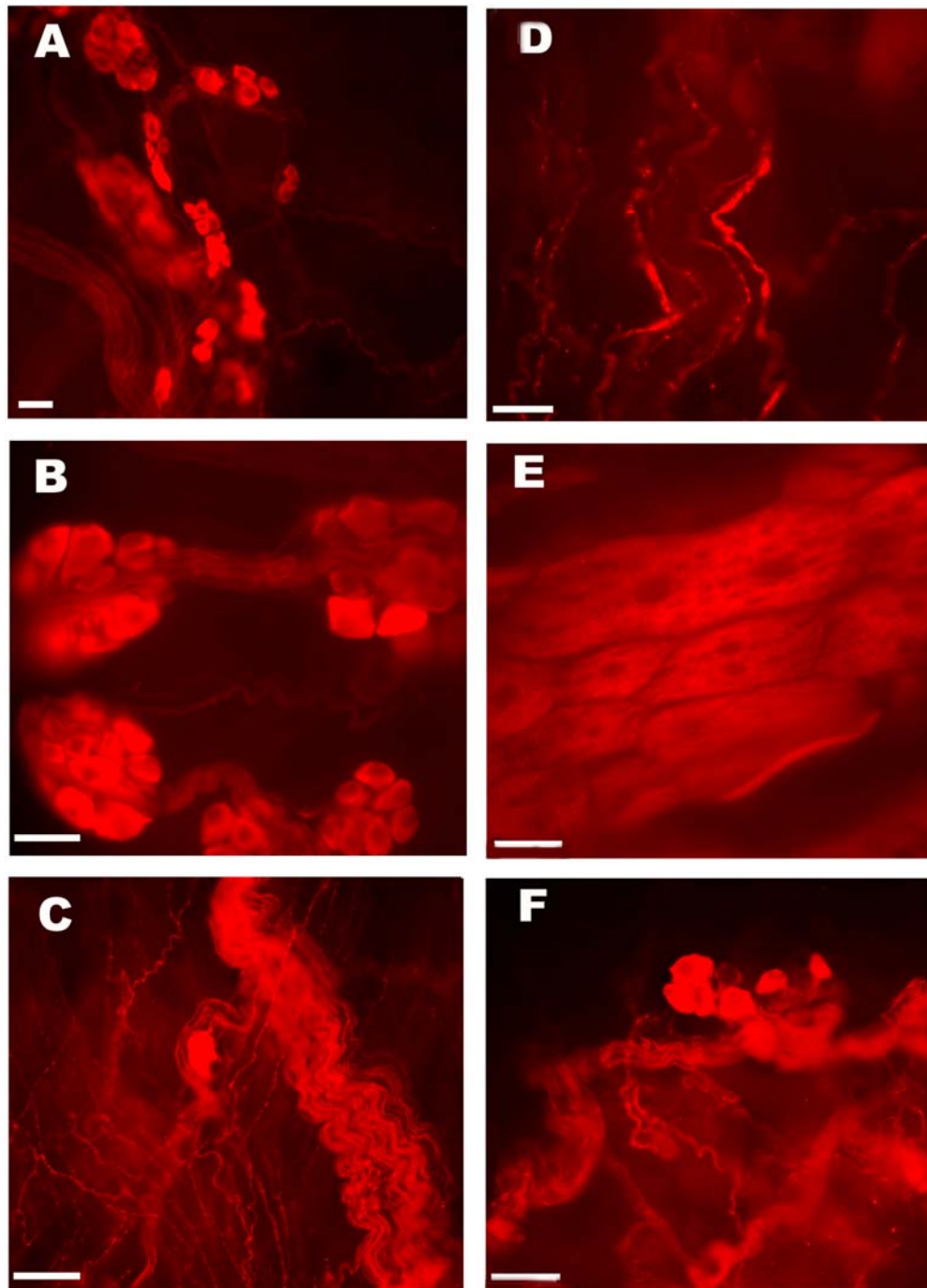


Figura 38. Detalle de estructuras inmunorreactivas a nNOS en vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. *A*, *B*, *C* y *F*: Ganglios intramurales y troncos nerviosos en trígono a pequeños (*A*) y grandes aumentos (*B* y *C*), y en cúpula (*F*) de la capa muscular SAM-R1. *D*: inervación perivascular en la lámina propia del detrusor en SAM-P8. *E*: Células epiteliales en SAM-R1. Barra= 25 μ m.

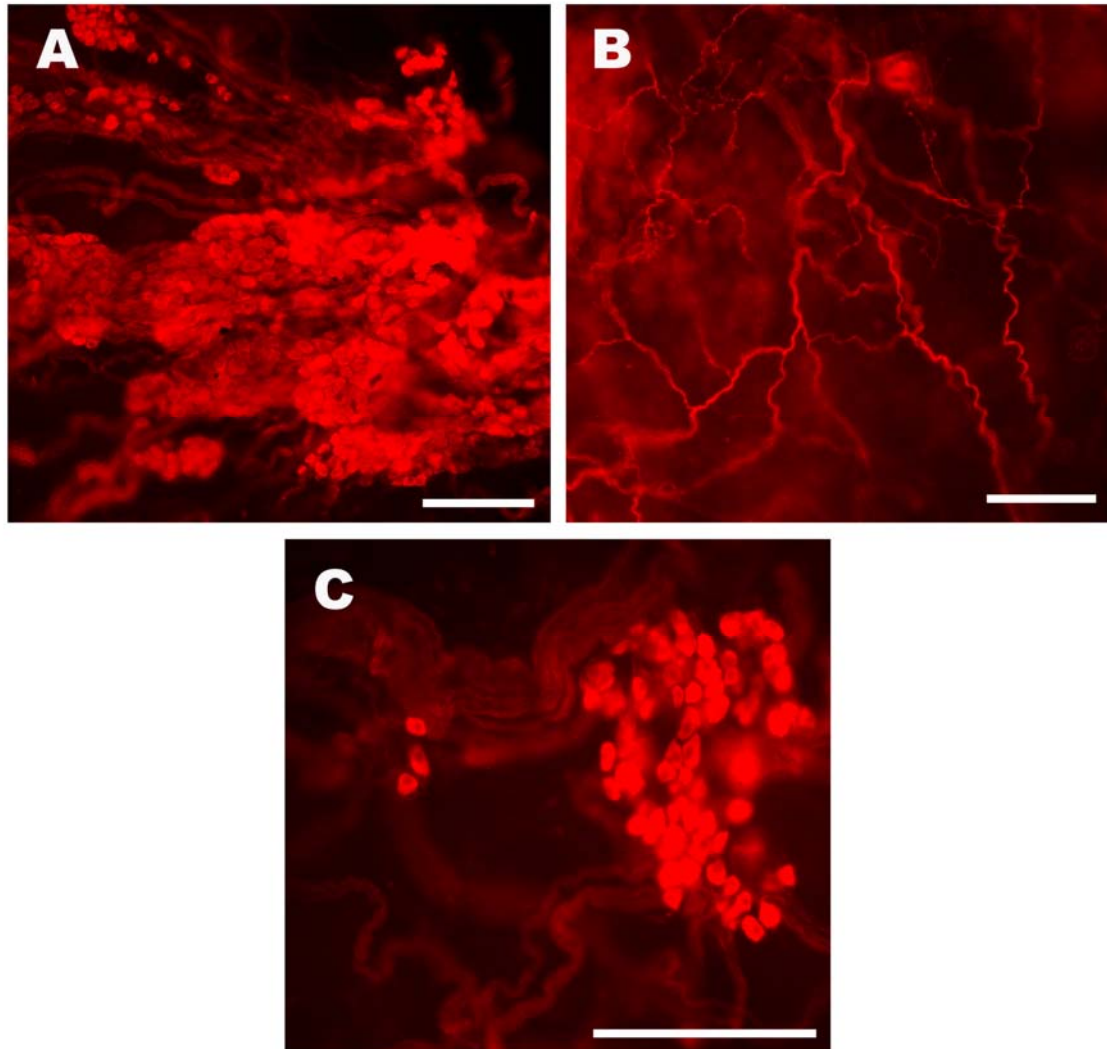


Figura 39. Detalle de estructuras inmunorreactivas a nNOS en vejiga de machos SAM-R1. **A** y **C**: Ganglios intramurales y troncos nerviosos en trígono de capa muscular a menores (**A**) y mayores (**C**) aumentos. **B**: Inervación nitrérgica en detrusor de lámina propia. Barra= 50 µm.

VEJIGA SAM-R1

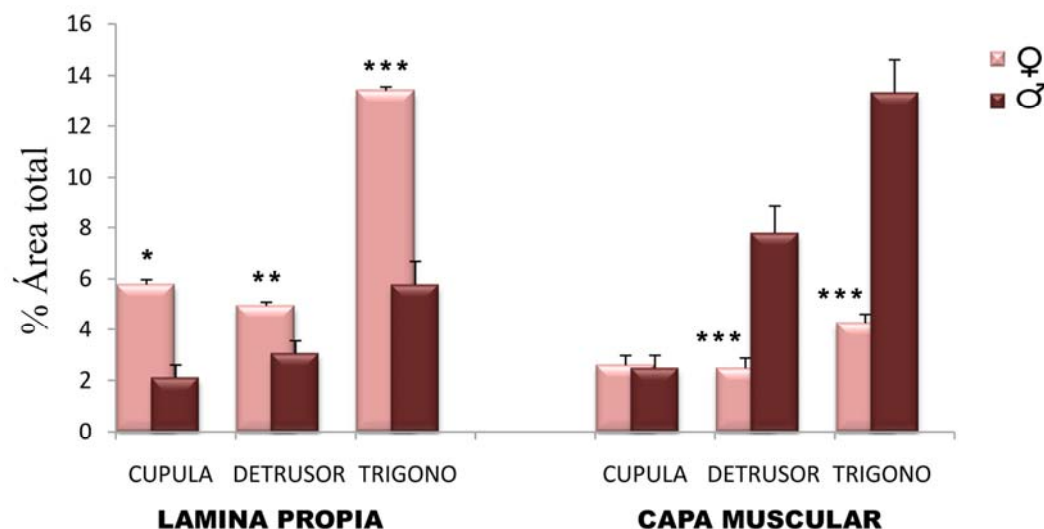


Figura 40. Diferencias entre el macho y la hembra en la inmunorreactividad a nNOS en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-R1. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 4 animales diferentes). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

VEJIGA ♀

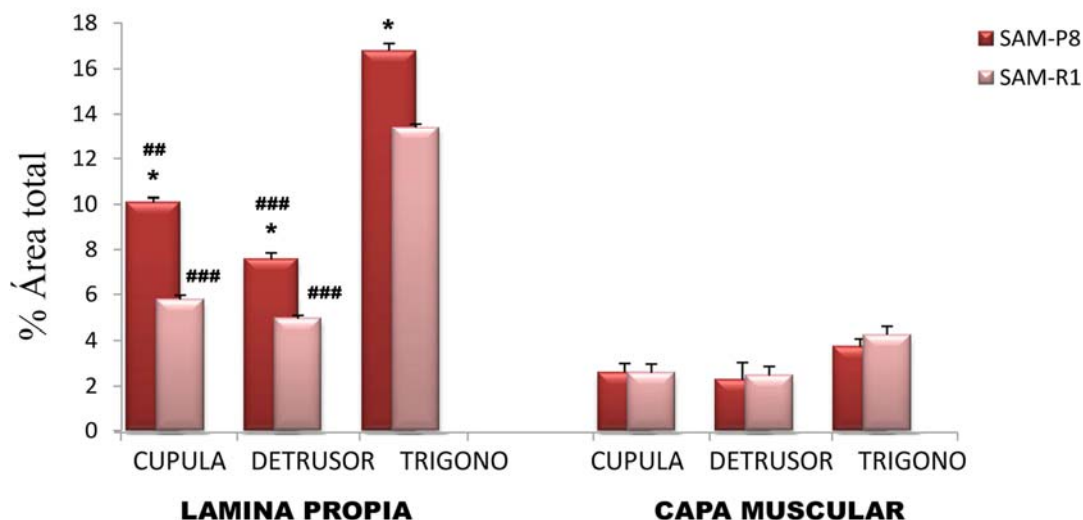


Figura 41. Cuantificación de la inmunorreactividad a nNOS en diferentes regiones vesicales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 4 animales diferentes). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1, y ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ respecto al trigono.

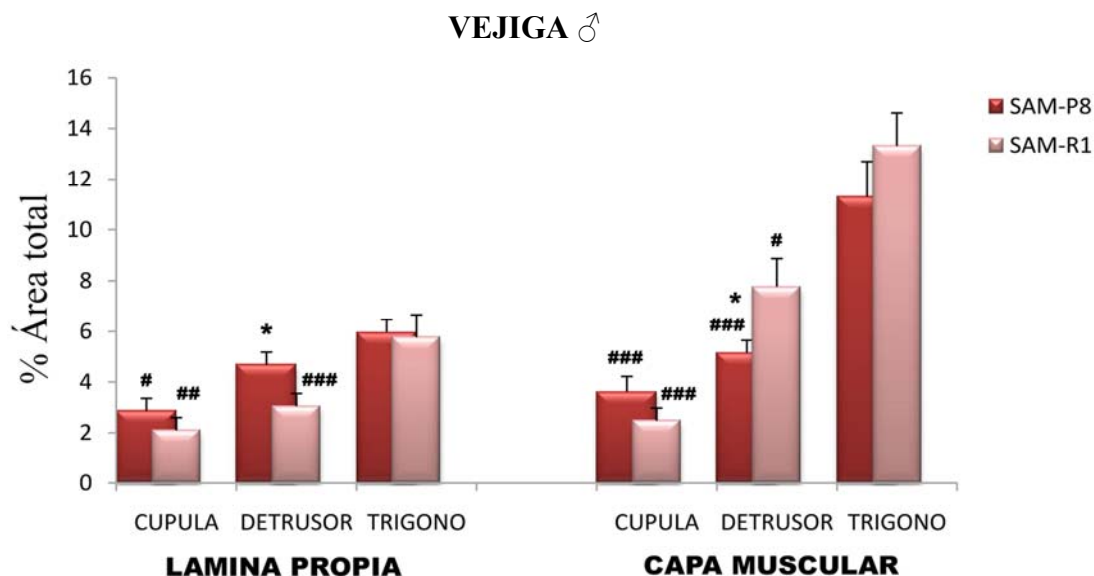


Figura 42. Cuantificación de la inmunorreactividad a nNOS en diferentes regiones vesicales de ratones macho SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 4 animales diferentes). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1, # $p<0,05$, ## $p<0,01$ y ### $p<0,001$ respecto al trigono.

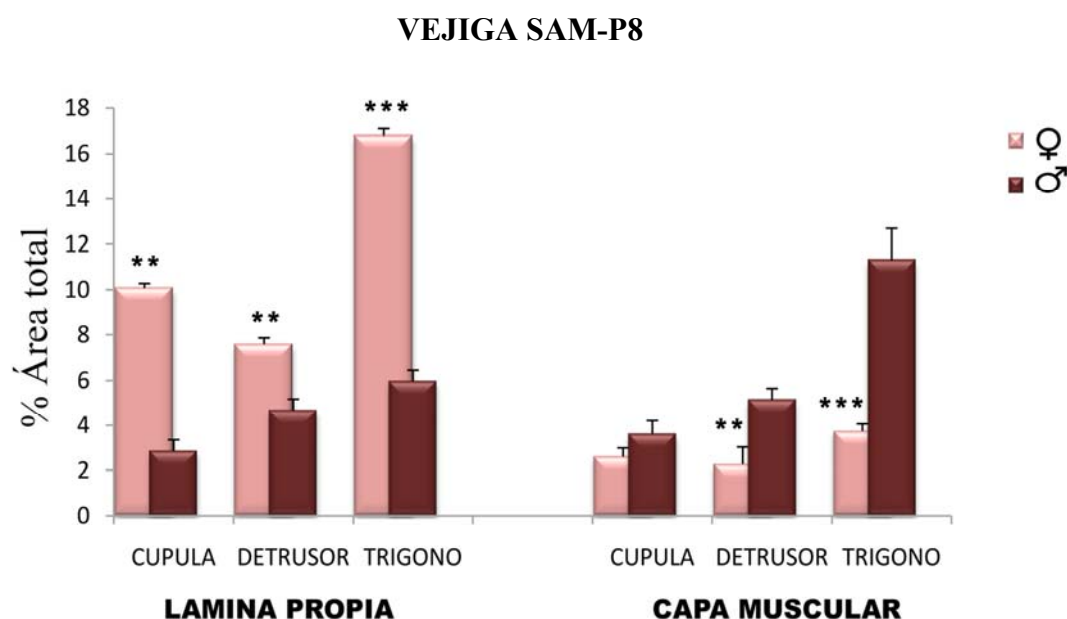


Figura 43. Diferencias entre machos y hembras en la inmunorreactividad a nNOS en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 4 animales diferentes). ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

4.2.5.3. Inervación adrenérgica

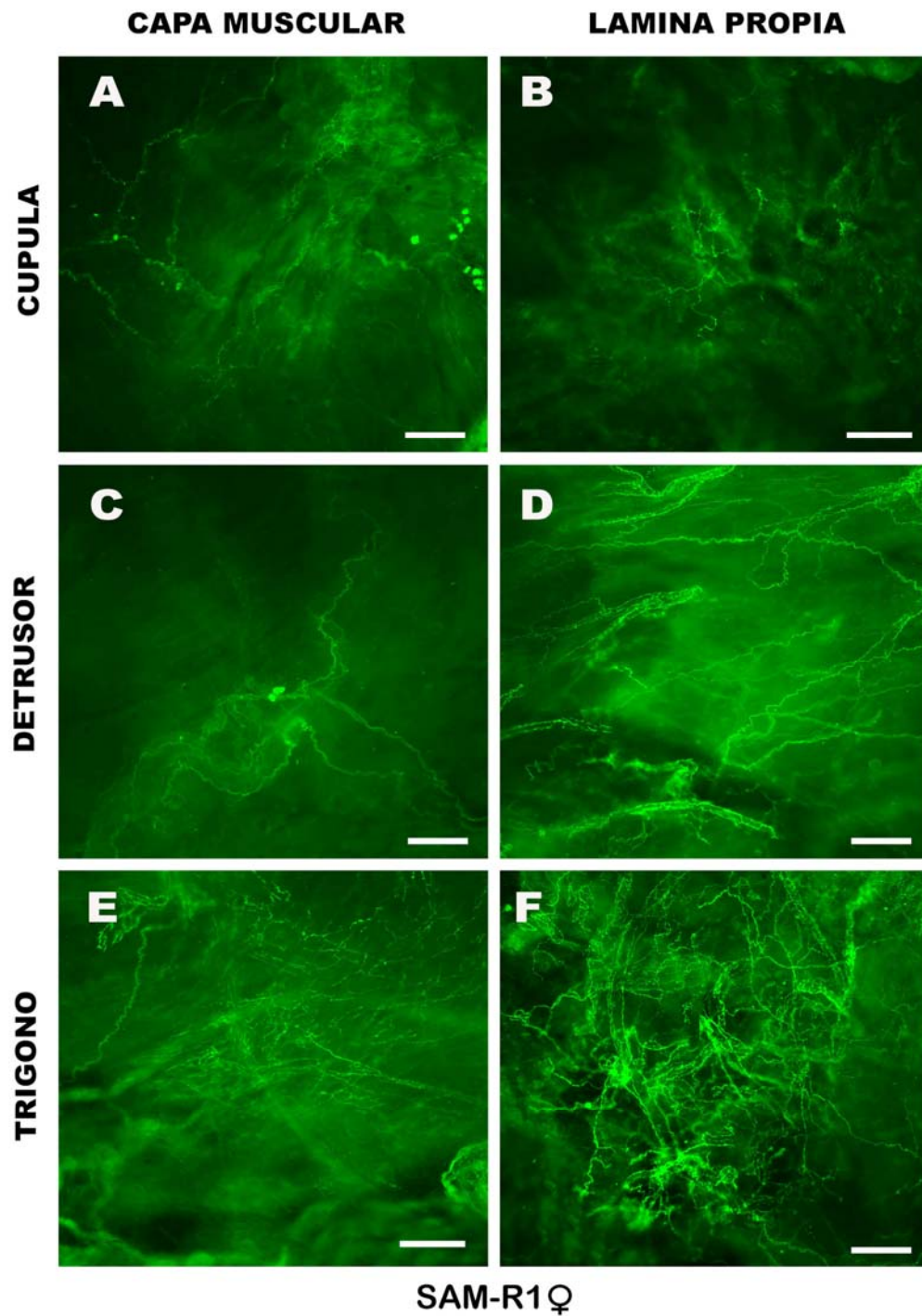


Figura 44. Inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-R1: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). La mayor densidad de inervación se encuentra en la lámina propia del trigono. Se pueden apreciar algunos ganglios intramurales en la capa muscular (**A** y **C**). . Barra= 100 μ m.

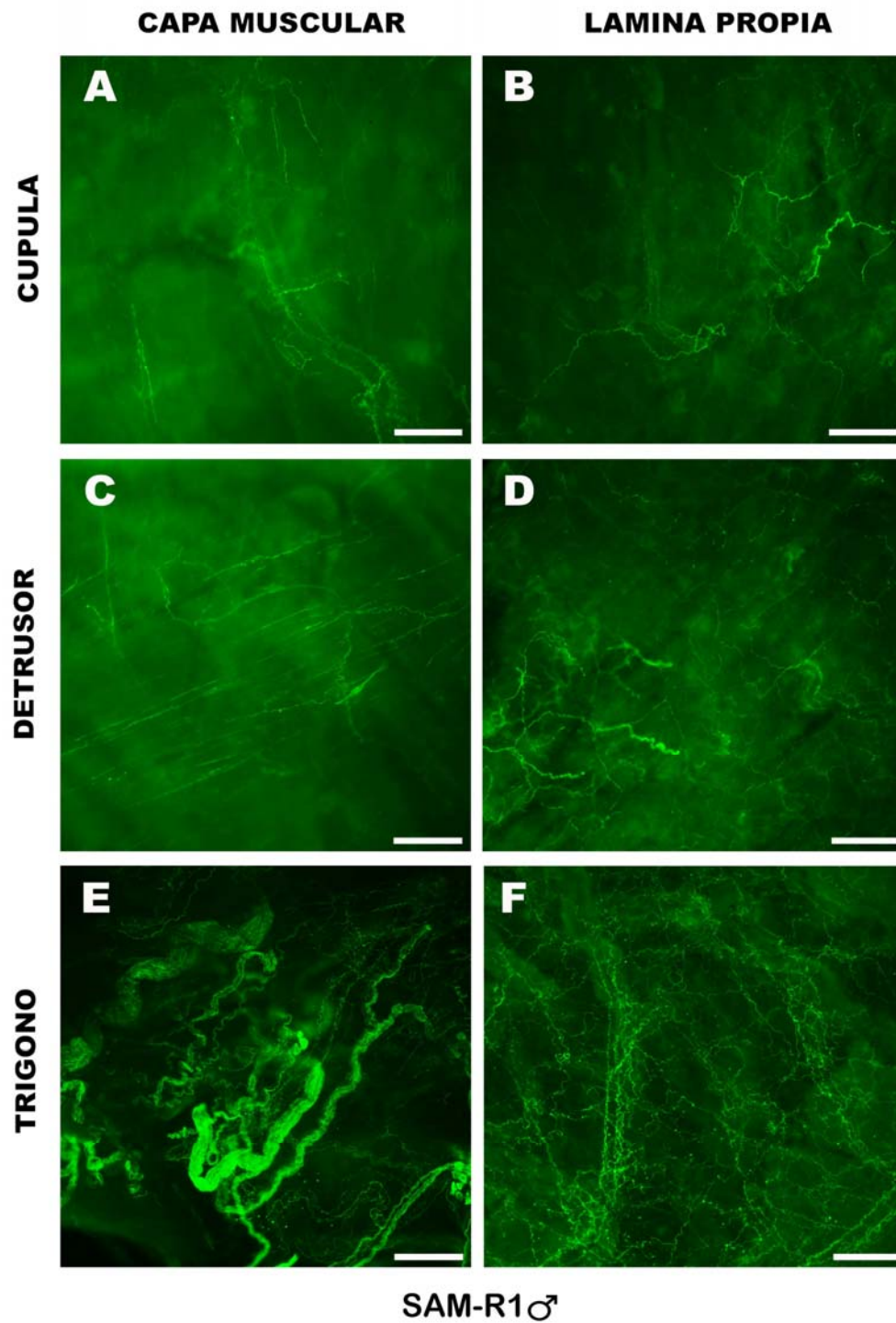


Figura 45. Inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-R1: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). Se puede observar una mayor densidad de innervación adrenérgica en el trigono, con numerosos troncos nerviosos y ganglios intramurales. Barra= 100 μ m.

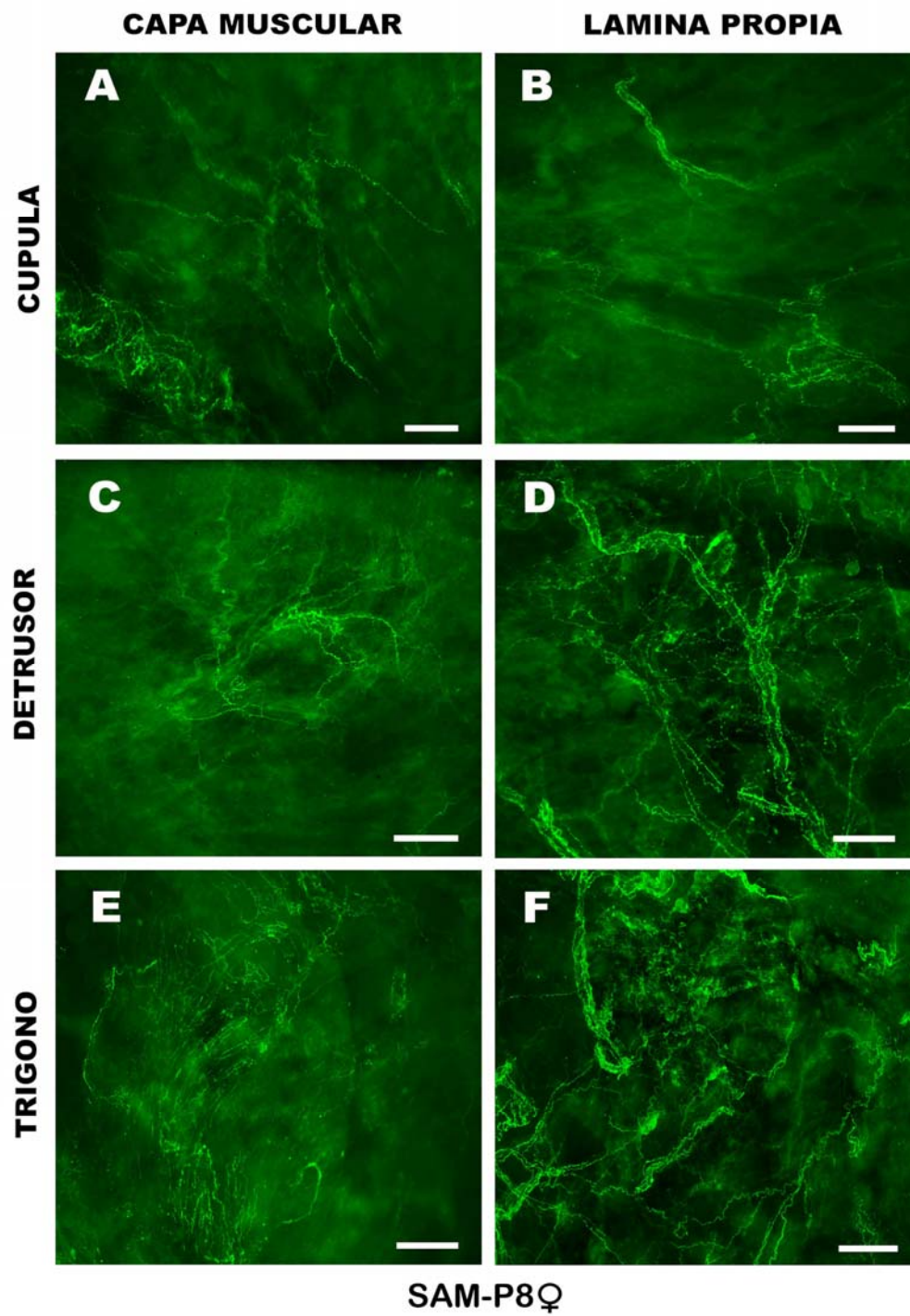


Figura 46. Inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-P8: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). No se observan diferencias respecto a SAM-R1. Barra= 100 μ m.

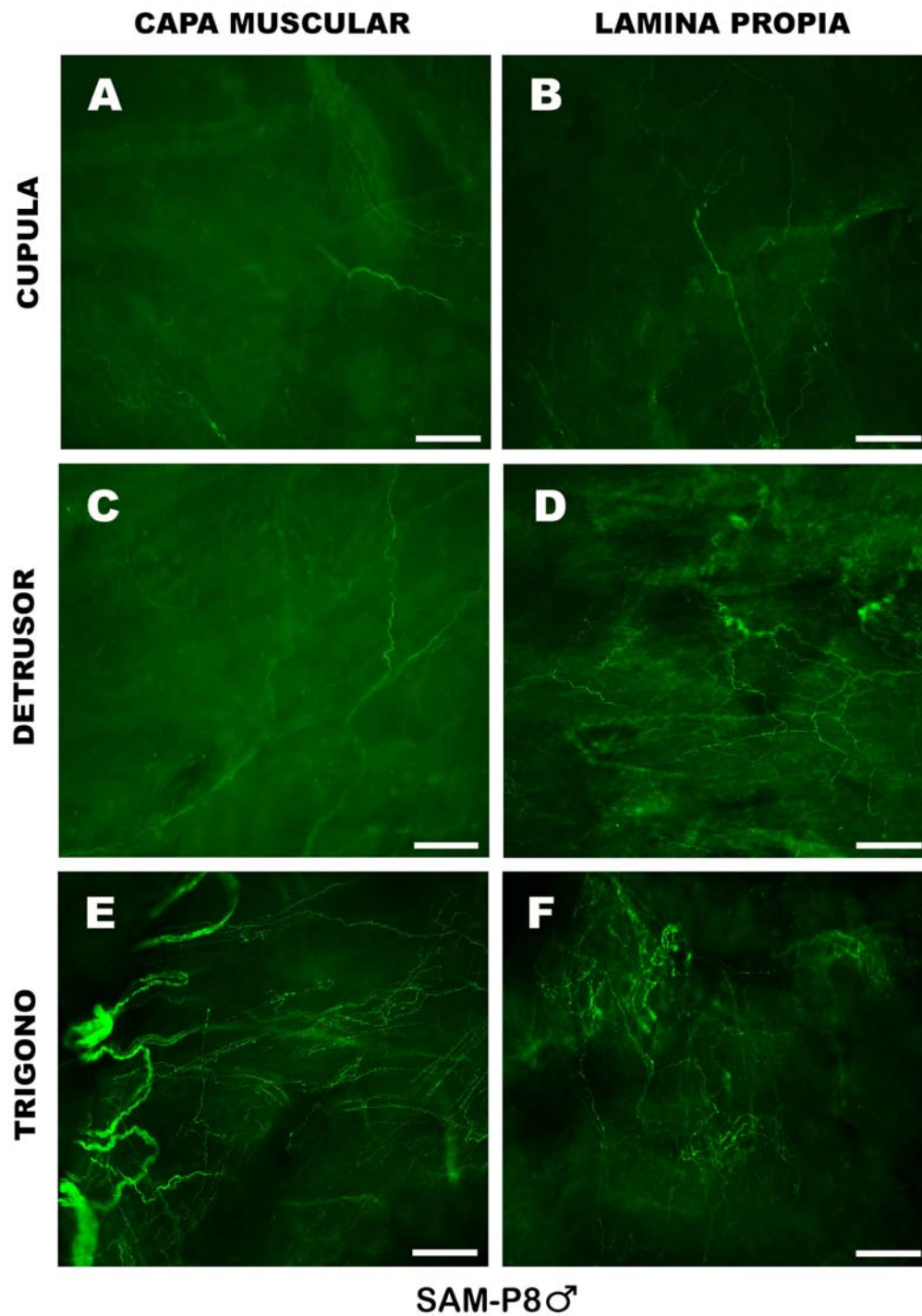


Figura 47. Inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-P8: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). Obsérvese la disminución en la densidad de inervación con respecto a SAM-R1. Barra= 100 μ m.

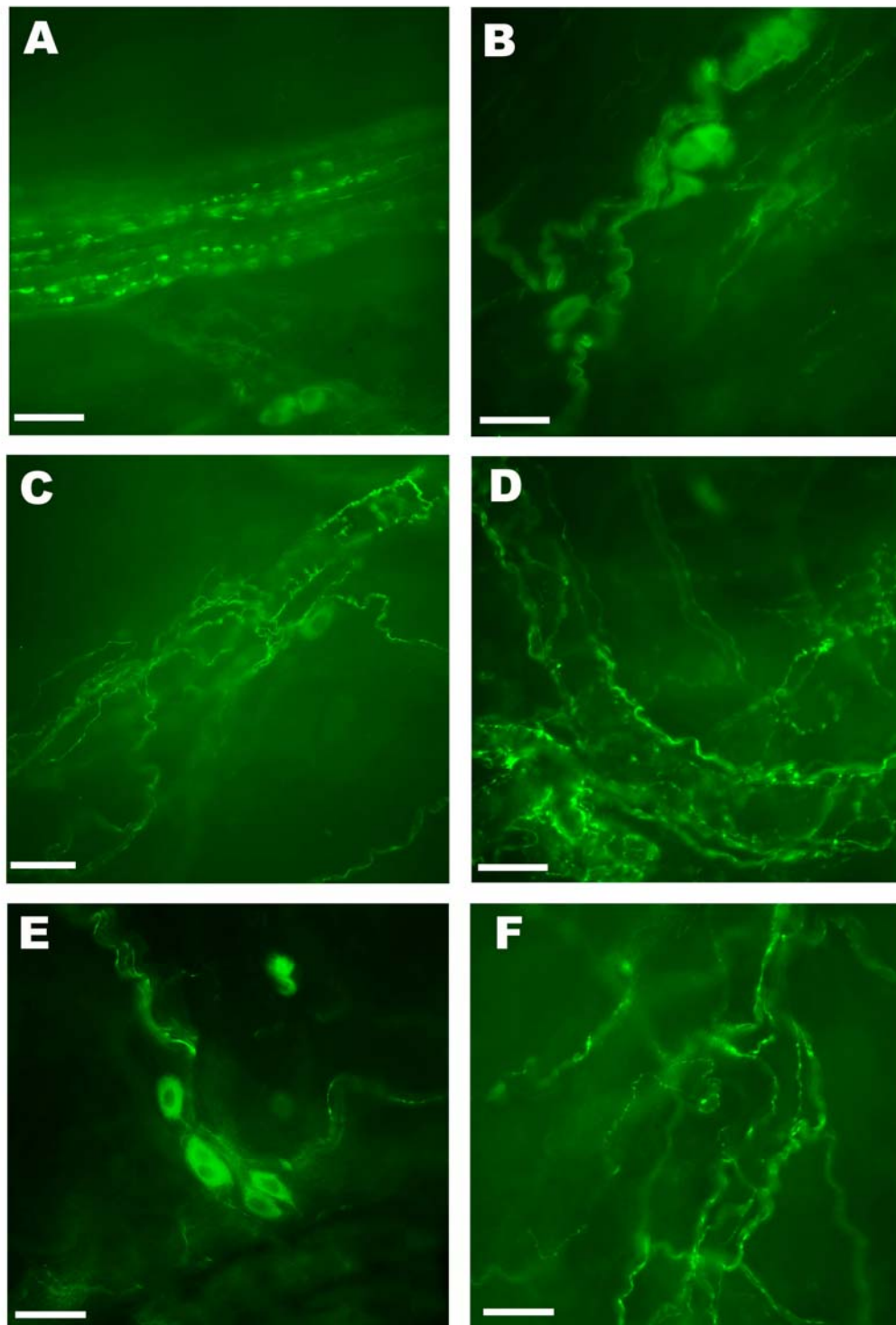


Figura 48. Detalle de estructuras inmunorreactivas a TSH en vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. **A**, **B** y **C**: Trígono de capa muscular SAM-R1. **A** y **B**: Troncos nerviosos junto a ganglios intramurales. **C**: terminaciones nerviosas finas junto a un ganglio. **D**, **E** y **F**: trígono de lámina propia SAM-P8. **D**: inervación perivascular. **E**: ganglios intramurales. **F**: terminaciones nerviosas finas. Barra= 25 μ m.

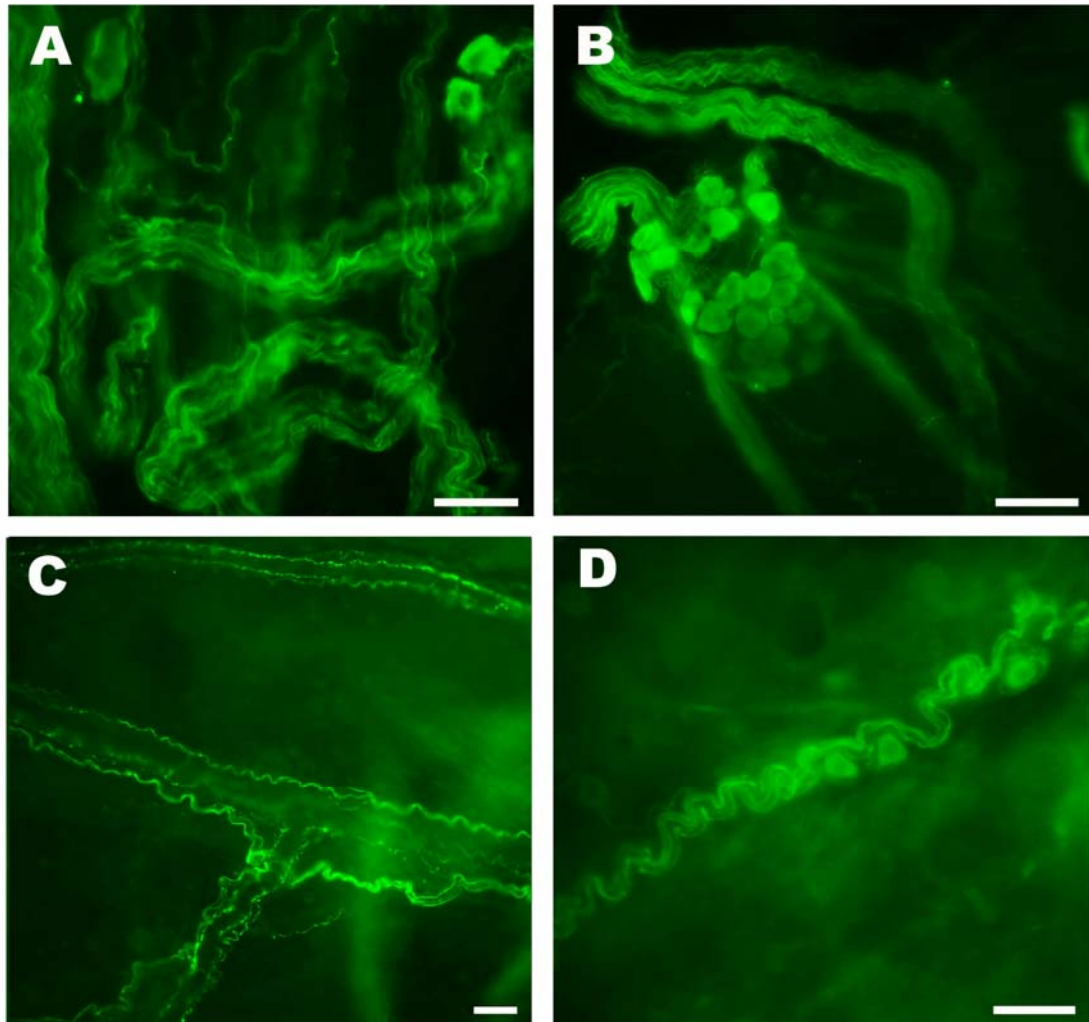


Figura 49. Detalle de estructuras inmunorreactivas a TSH en vejiga de machos SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*. Troncos nerviosos y ganglios intramurales en trígono de capa muscular SAM-P8 y SAM-R1 respectivamente. *C*. Inervación perivascular en zona de trígono de lámina propia SAM-P8. *D*. Tronco nervioso y ganglios en trígono de lámina propia SAM-P8. Barra= 25 μ m.

VEJIGA SAM-R1

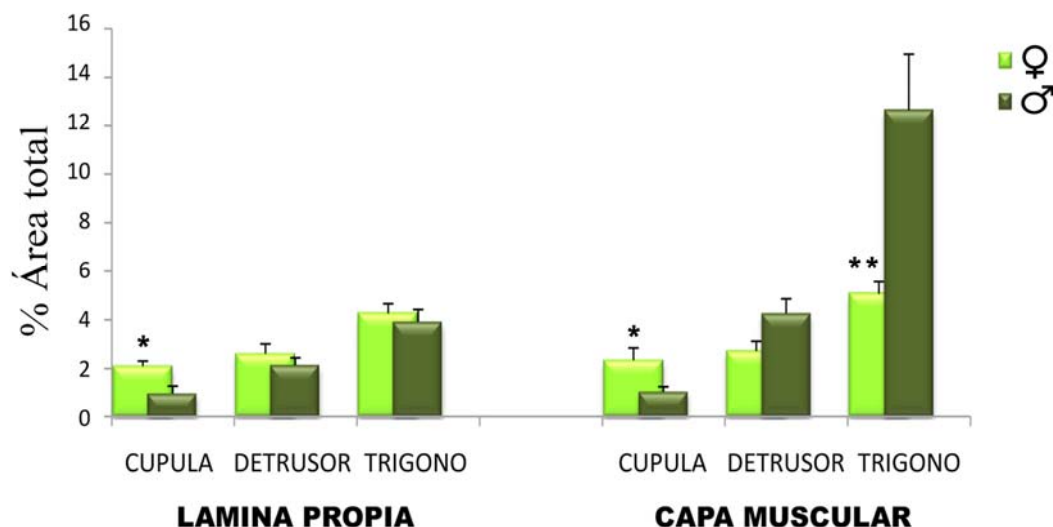


Figura 50. Diferencias entre machos y hembras en la inmunorreactividad a TSH en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-R1. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 3 animales diferentes). * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

VEJIGA ♀

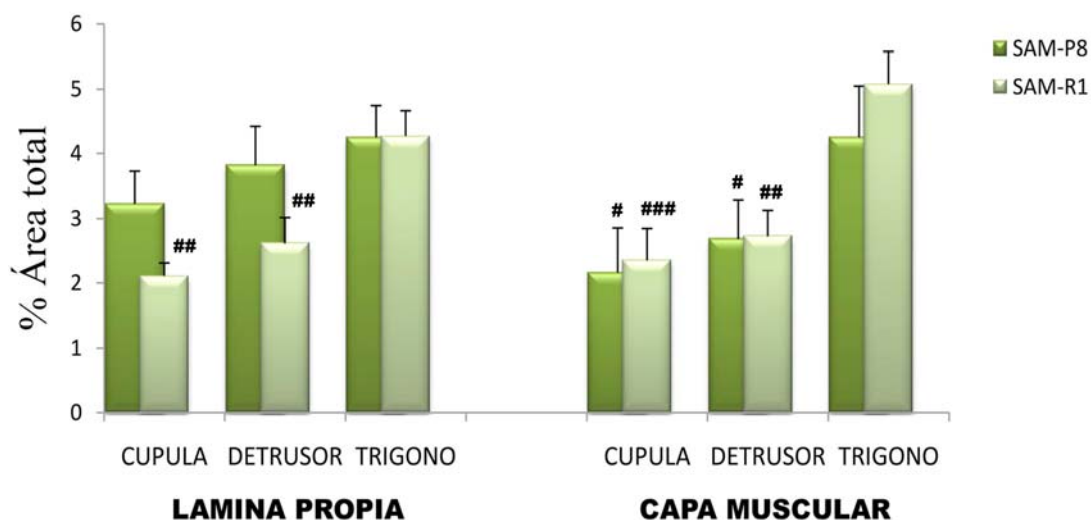


Figura 51. Cuantificación de la inmunorreactividad a TSH en diferentes regiones vesicales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 4 animales diferentes). # $p<0,05$, ## $p<0,01$ y ### $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto al trigono.

VEJIGA ♂

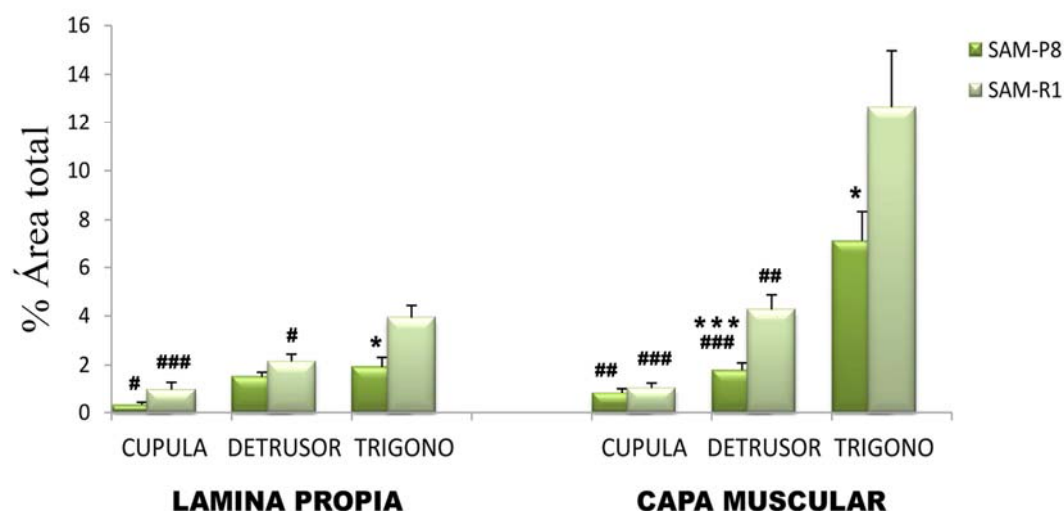


Figura 52. Cuantificación de la inmunorreactividad a TSH en diferentes regiones vesicales de ratones macho SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 3 animales diferentes): * $p<0,05$, *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1, # $p<0,05$, ## $p<0,01$ y ### $p<0,001$ respecto al trigono.

VEJIGA SAM-P8

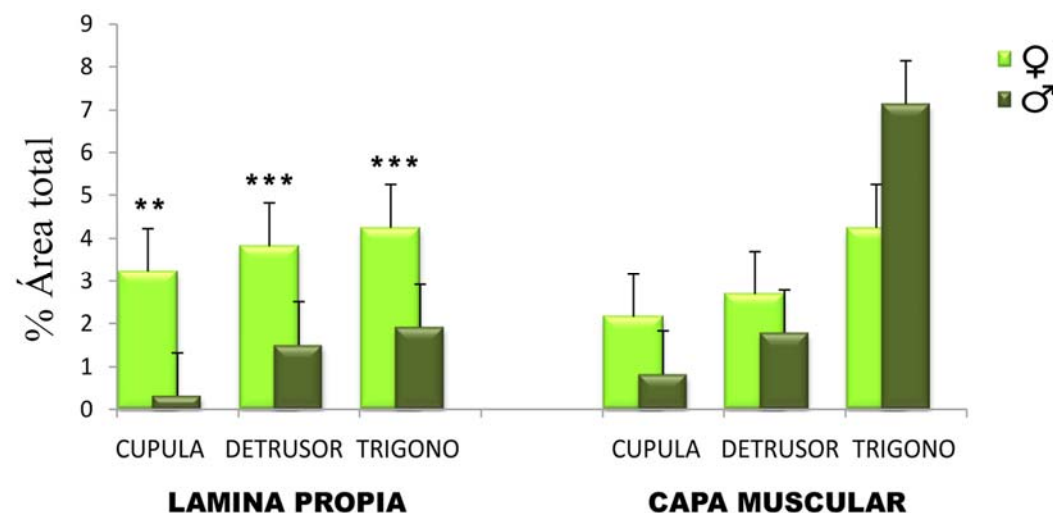


Figura 53. Diferencias entre machos y hembras en la inmunorreactividad a TSH en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 10X de al menos 3 animales diferentes). ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

4.2.6. Cambios en la densidad de ICCs vesicales positivas a vimentina

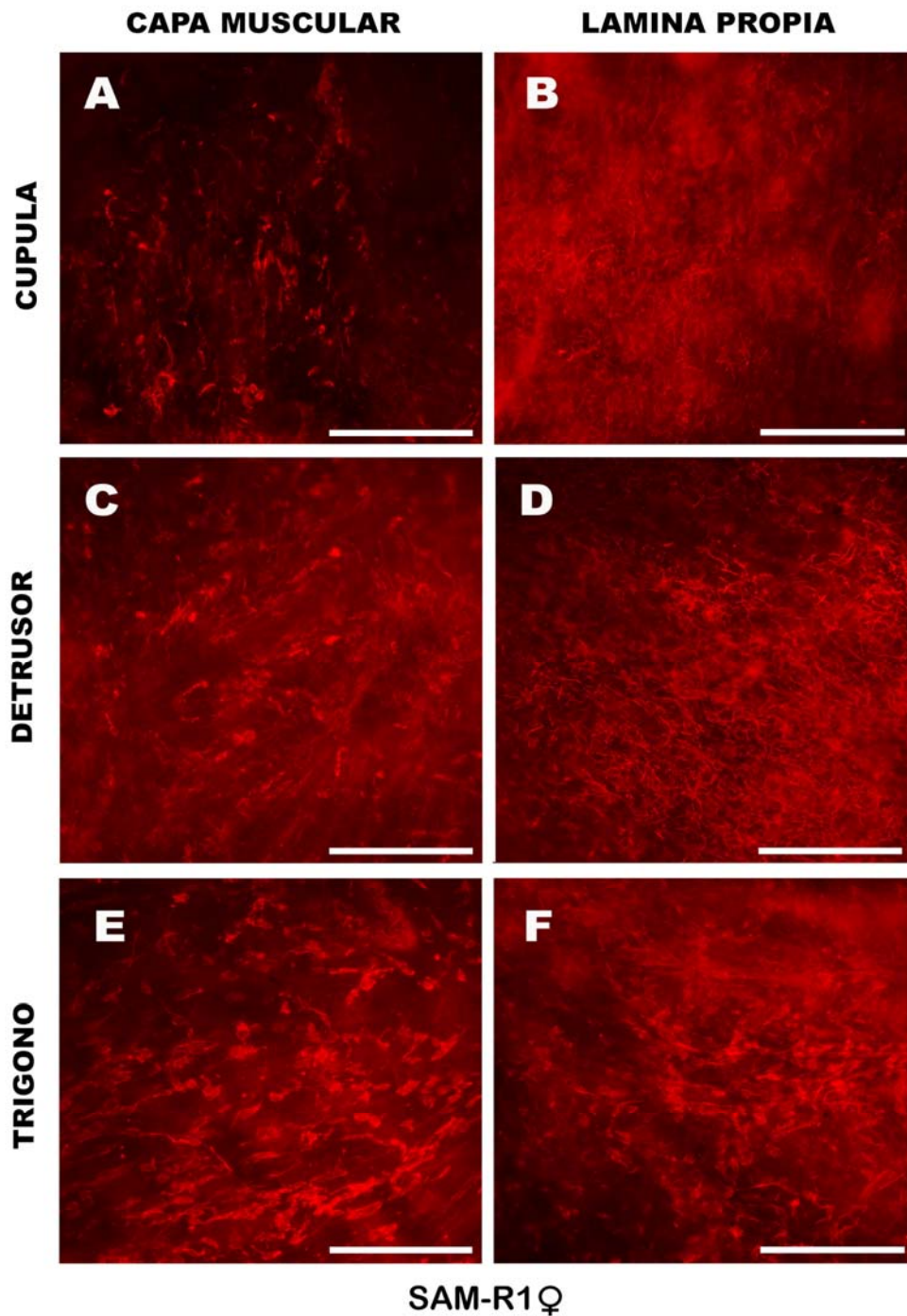


Figura 54. Inmunorreactividad a vimentina en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (A, C, E) y lámina propia (B, D, F) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-R1: cúpula (A, B), detrusor (C, D) y trigono (E, F). Destaca la gran densidad de ICCs en todas las regiones de la vejiga con diferente morfología, estrellada (B y D) o fusiforme (en el resto). Barra= 100 μ m.

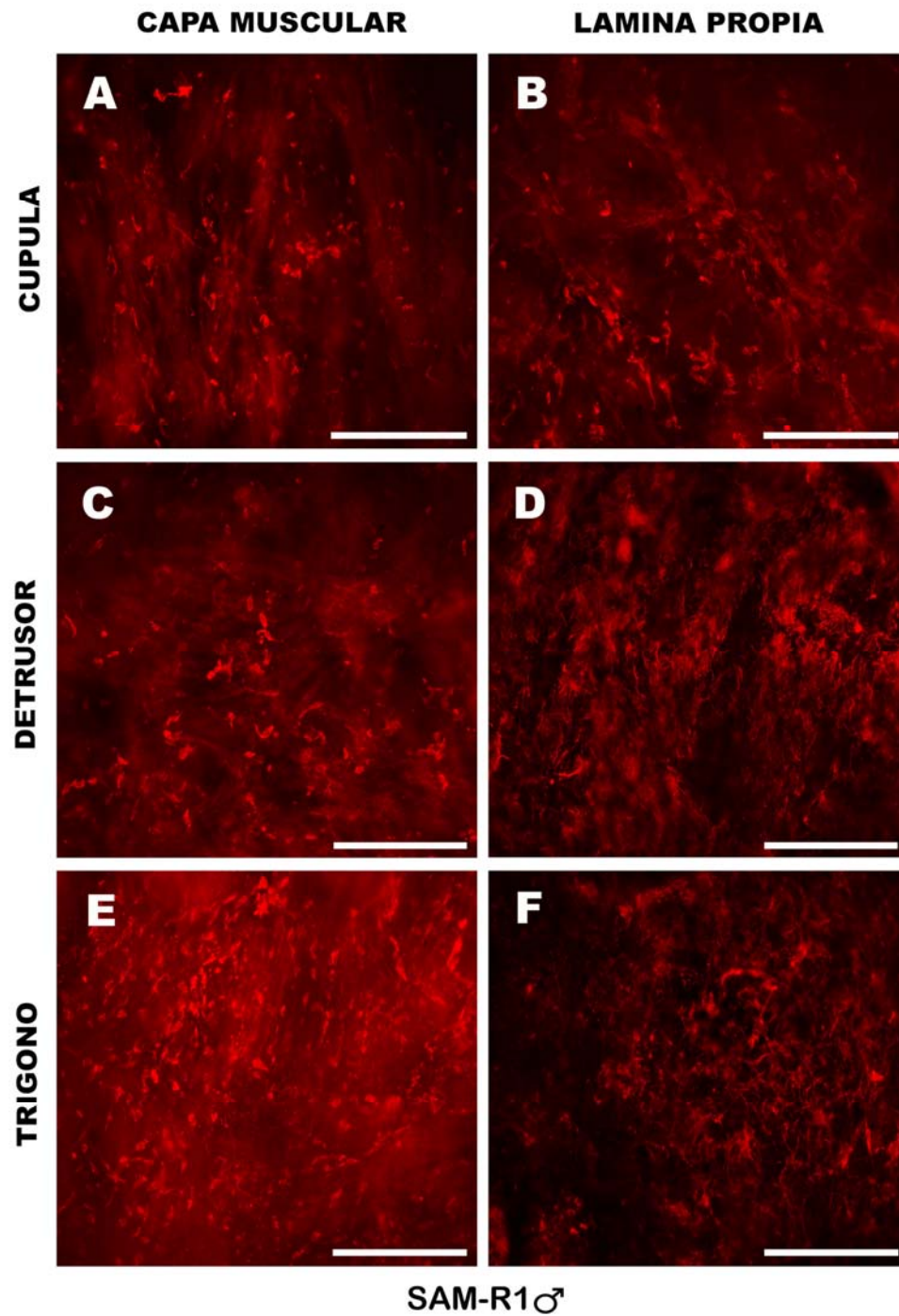


Figura 55. Inmunorreactividad a vimentina en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (A, C, E) y lámina propia (B, D, F) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-R1: cúpula (A, B), detrusor (C, D) y trigono (E, F). Al igual que en la hembra hay una alta densidad de ICCs de diferente morfología en todas las regiones. Barra= 100 μ m.

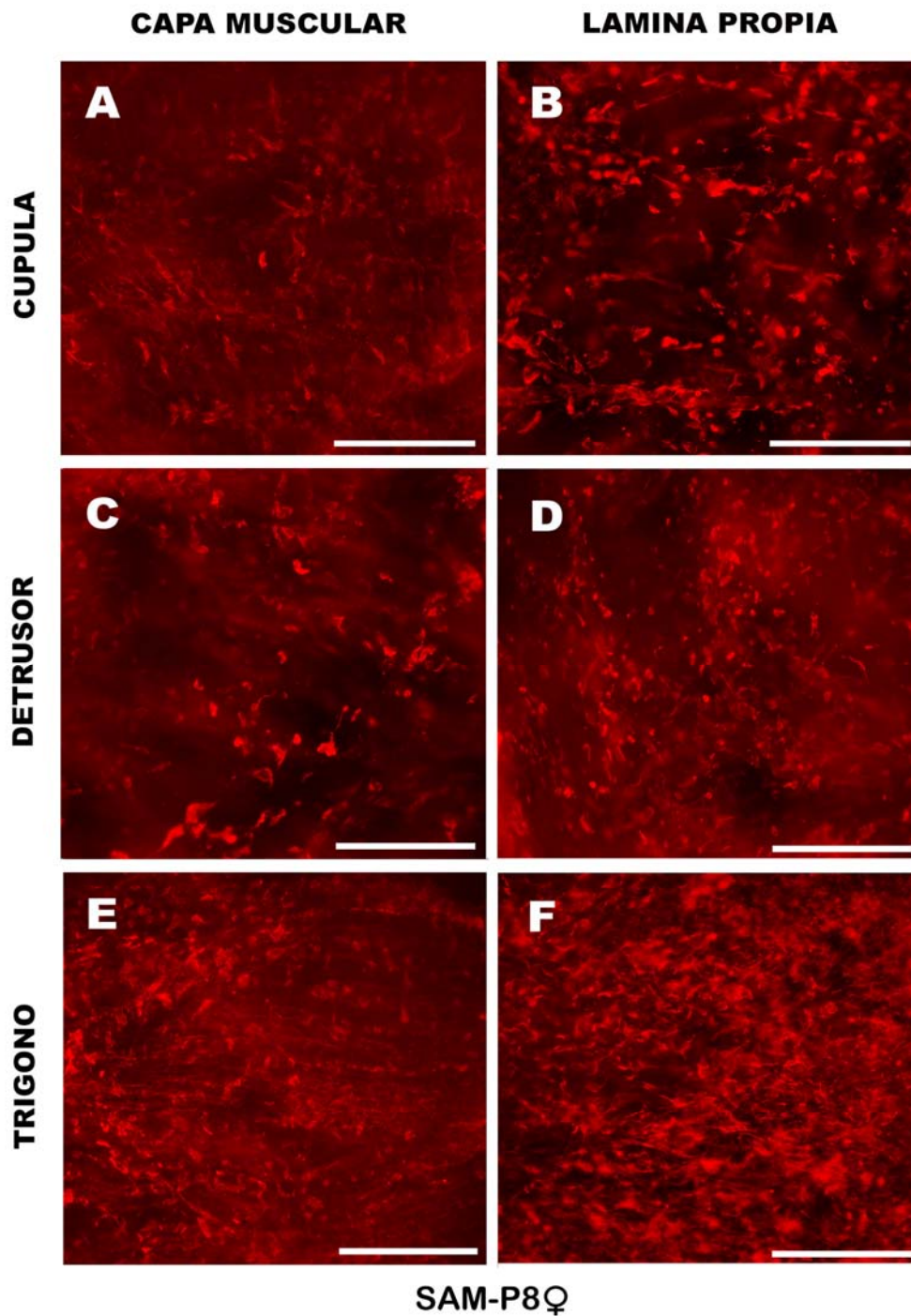


Figura 56. Inmunorreactividad a vimentina en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga hembra SAM-P8: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). Destaca un aparente aumento de densidad de ICCs en el trigono de la lámina propia con respecto a SAM-R1. Barra= 100 μ m.

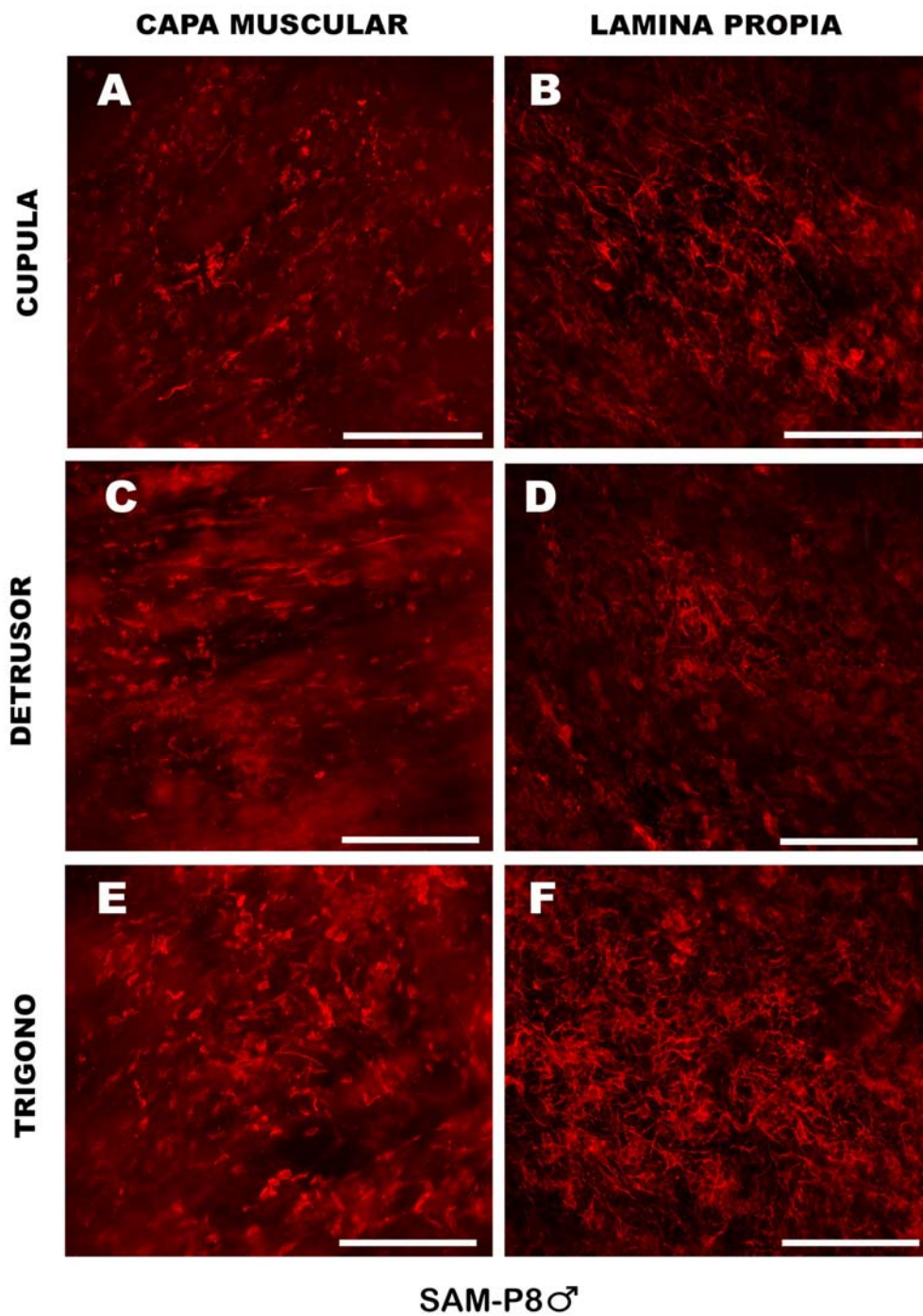


Figura 57. Inmunorreactividad a vimentina en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de vejiga macho SAM-P8: cúpula (**A**, **B**), detrusor (**C**, **D**) y trigono (**E**, **F**). Destaca un aumento en la densidad de ICCs en la zona del trigono de la lámina propia con respecto a SAM-R1. Barra = 100 μ m.

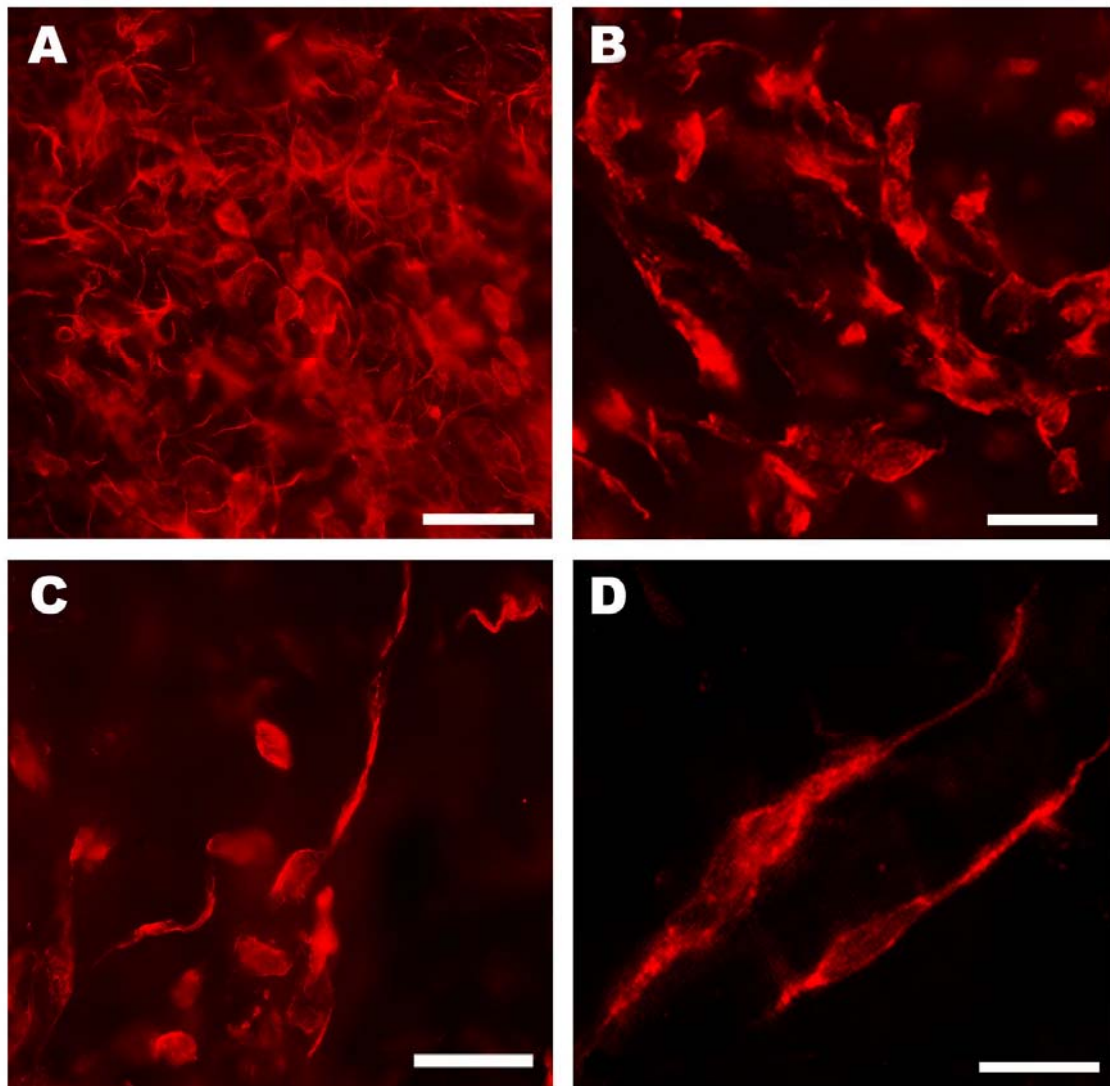


Figura 58. Detalle de ICCs positivas a vimentina en vejiga de hembras SAM-R1 y SAM-P8. *A, C y D:* ICCs en trígono de la lámina propia SAM-R1, con morfología estrellada en *A* y fusiforme en *C y D*. *B:* ICCs con morfología fusiforme en zona de detrusor de lámina propia de SAM-P8. Barra= 25 μ m (*A, B y C*) y 6 μ m (*D*).

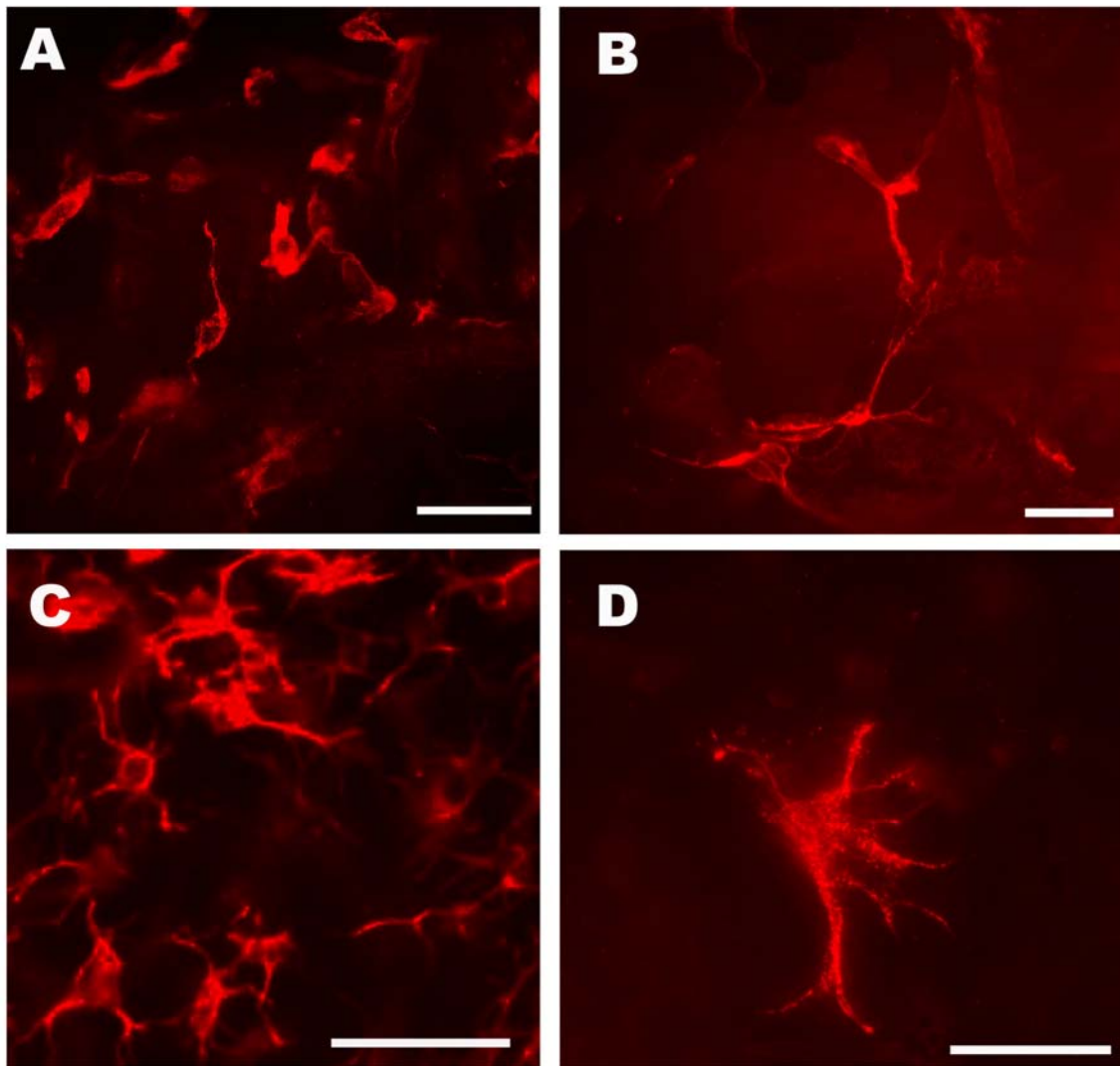


Figura 59. Detalle de ICCs inmunorreactivas a vimentina en trigono de vejiga macho SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*: ICCs fusiformes en la capa muscular de SAM-P8 y SAM-R1 respectivamente. *C* y *D*: ICCs estrelladas con numerosas prolongaciones en la lámina propia de SAM-R1. Barra= 25 μ m (*A*, *B* y *C*) y 13 μ m (*D*).

VEJIGA SAM-R1

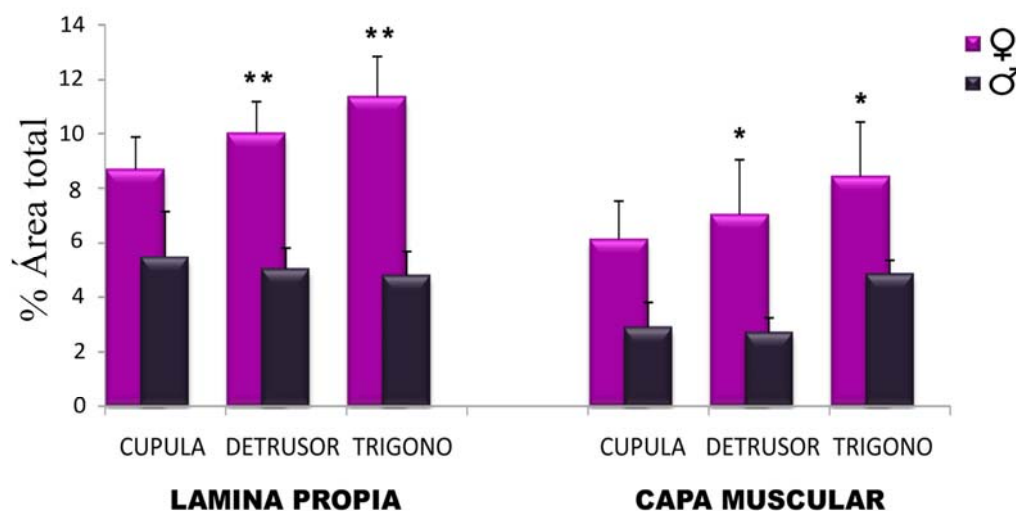


Figura 60. Diferencias entre machos y hembras en la inmunorreactividad a vimentina en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-R1. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

VEJIGA ♀

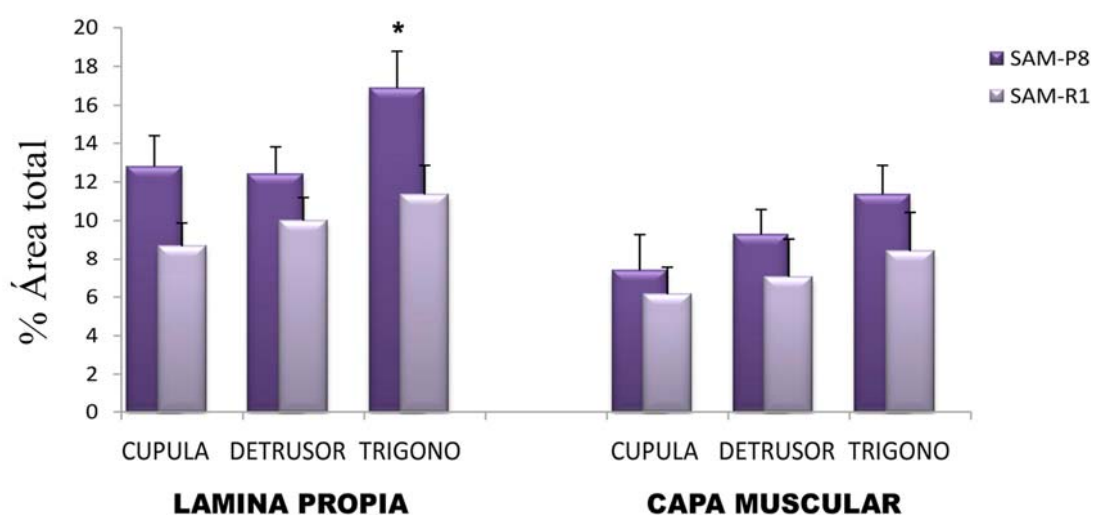


Figura 61. Cuantificación de la inmunorreactividad a vimentina en diferentes regiones vesicales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

VEJIGA ♂

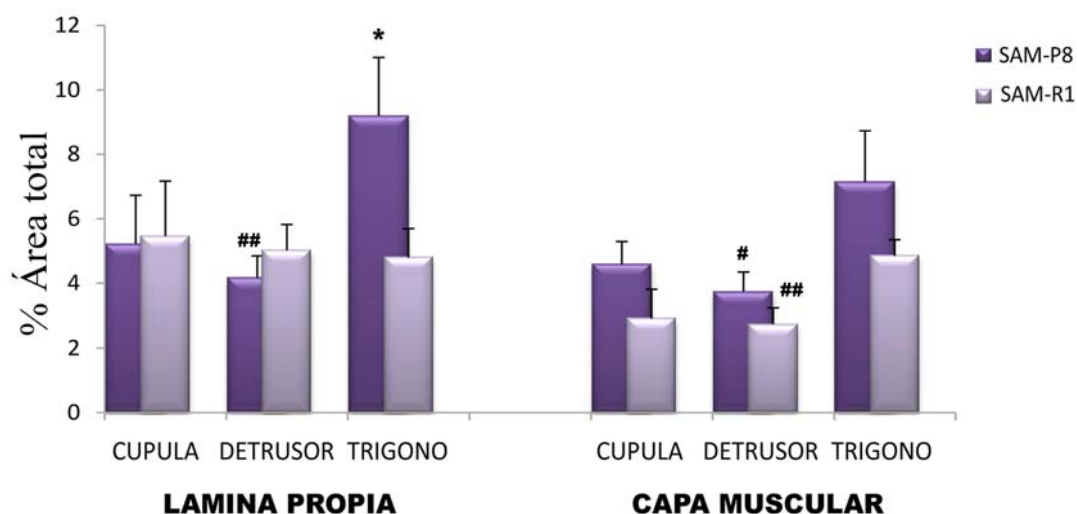


Figura 62. Cuantificación de la inmunorreactividad a vimentina en diferentes regiones vesicales de ratones macho SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n = 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). * $p < 0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto al trigono.

VEJIGA SAM-P8

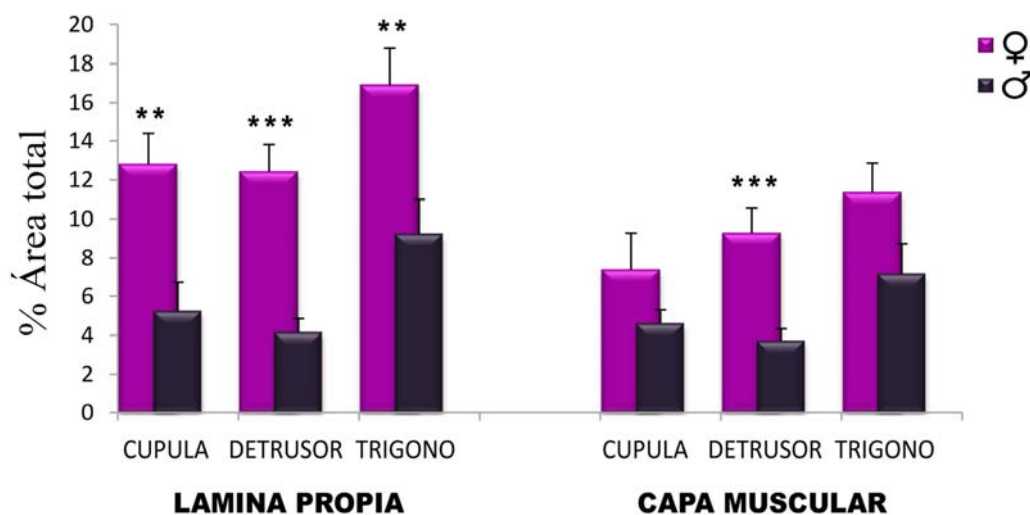


Figura 63. Diferencias entre machos y hembras en la inmunorreactividad a vimentina en diferentes regiones vesicales de ratones SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n = 5-10$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a los machos.

4.2.7. Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de innervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la vejiga de ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1

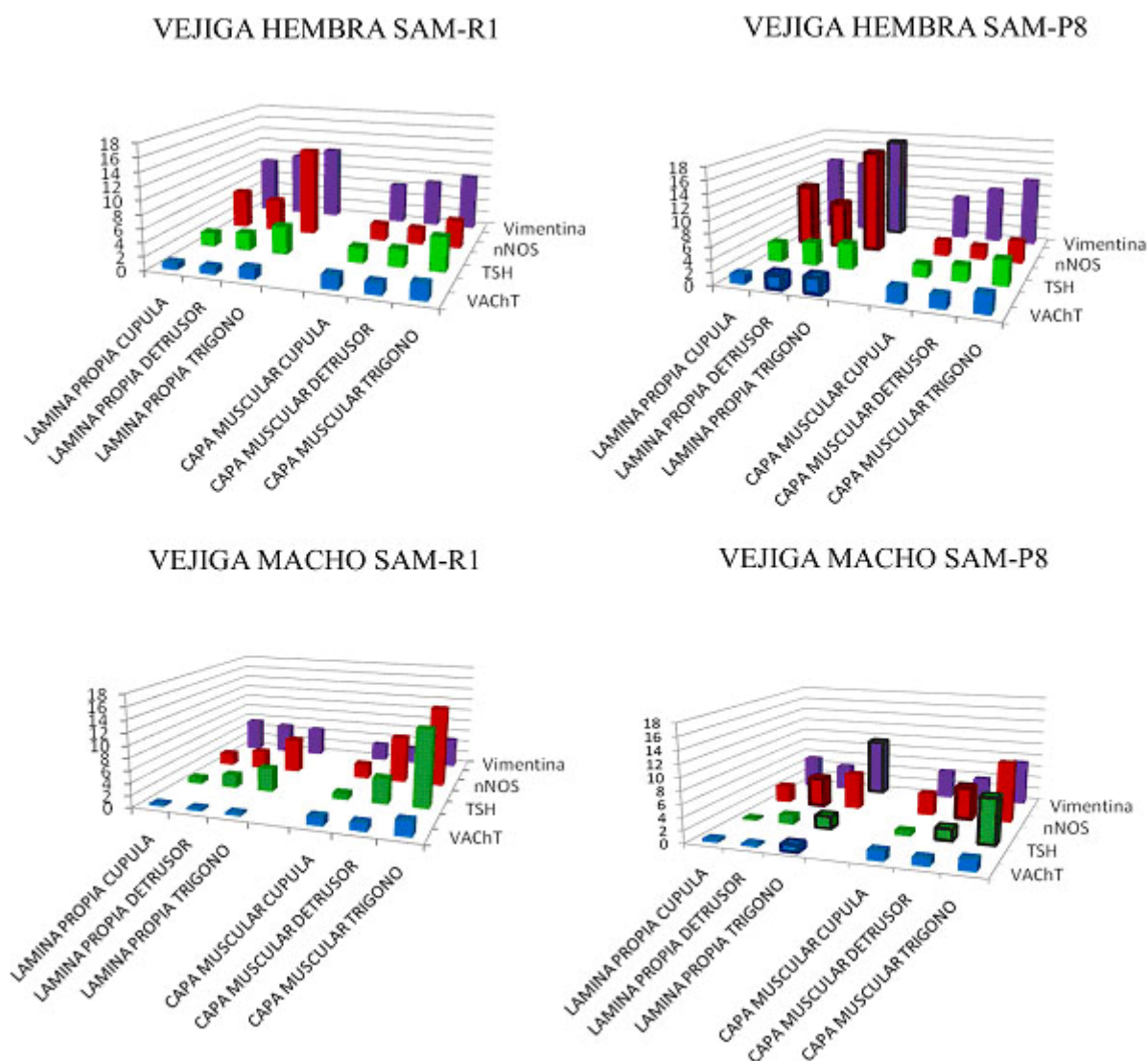


Figura 64. Gráficos resumen de la cuantificación de la inmunorreactividad a VACHT, TSH, nNOS y vimentina en diferentes regiones vesicales de ratones macho y hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como la media. Las barras marcadas con un borde más grueso señalan valores significativamente diferentes entre los animales control y los envejecidos.

4.2.8. Estudios de colocalización

4.2.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales

a) Acetilcolina (VACHT)- NO (nNOS)

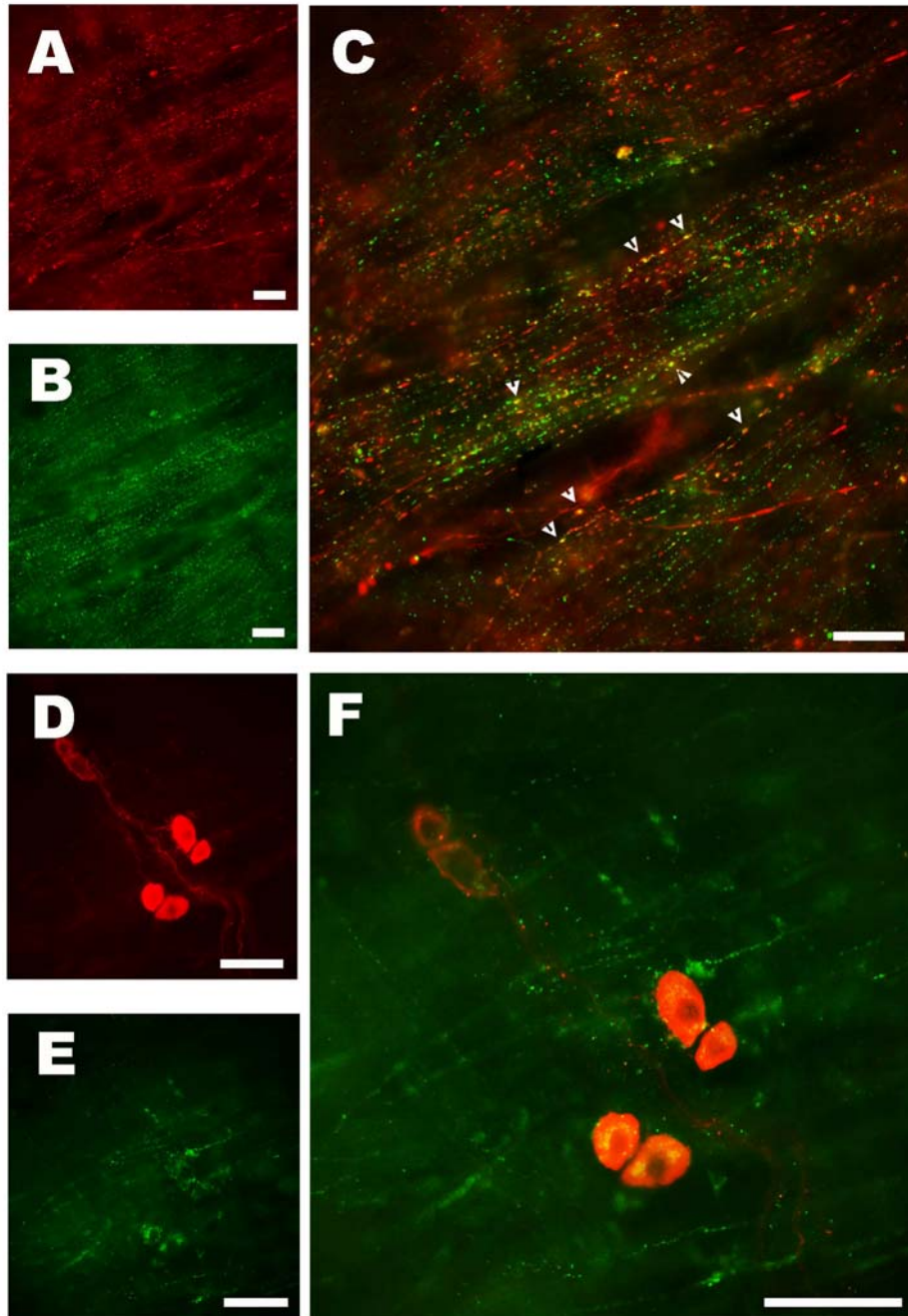


Figura 65. Doble marcaje a VACHT (verde) y nNOS (rojo) en la capa muscular de la cúpula de una preparación *whole-mount* de vejiga macho SAM-P8. **A**, **B** y **C**: Obsérvese a pequeños aumentos la aparente colocalización de ACh y nNOS en fibras intramurales. Las flechas denotan colocalización en las mismas varicosidades. **D**, **E** y **F**: A mayores aumentos se observan ganglios intramurales en los que colocalizan ACh (débilmente) y nNOS. Barra= 50 μ m.

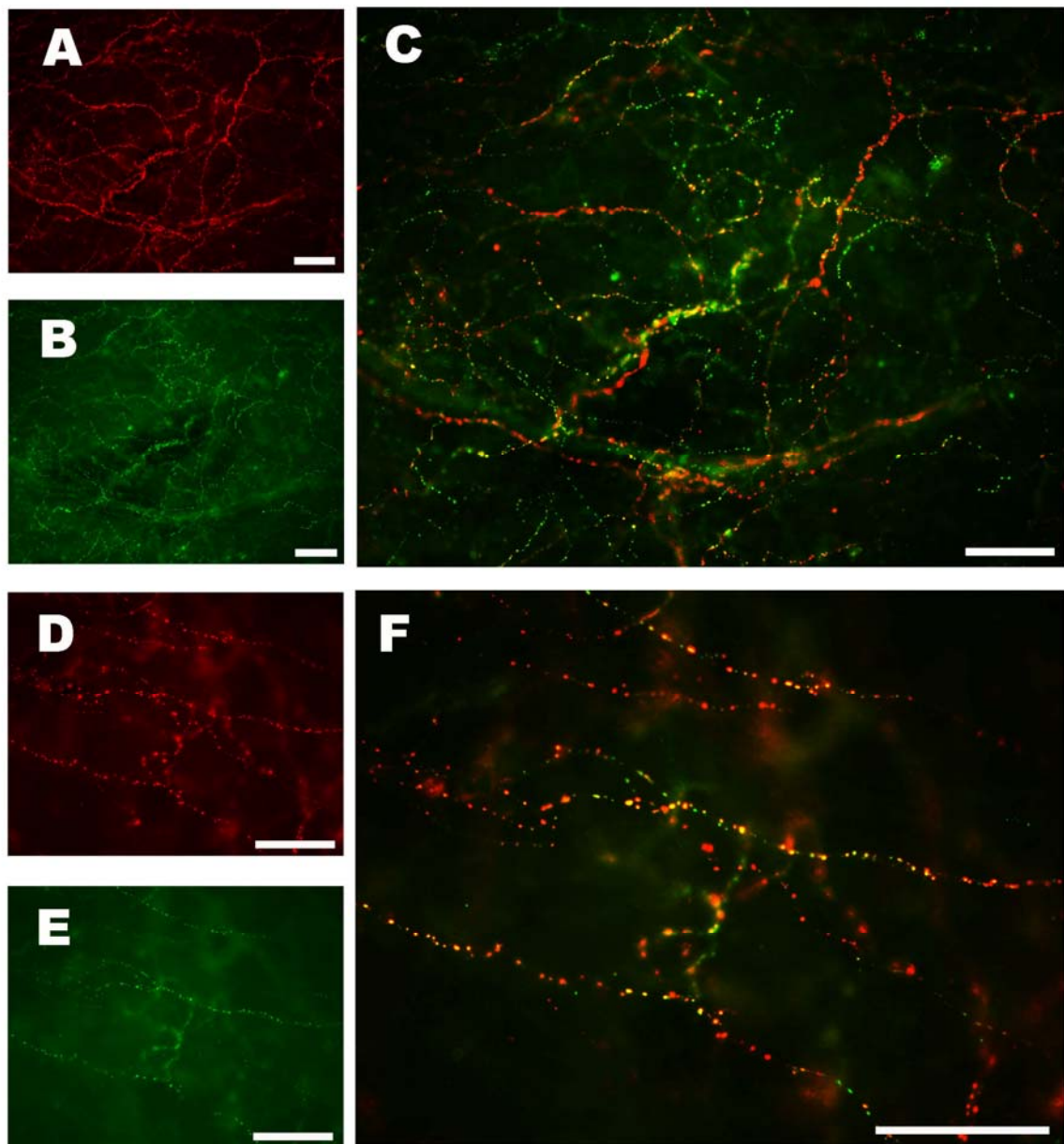


Figura 66. Doble marcaje a VACHT (verde) y nNOS (rojo) en la lámina propia de una preparación *whole-mount* de vejiga macho SAM-P8. Lámina propia del detrusor (**A**, **B** y **C**) y del trigono (**D**, **E** y **F**) donde se aprecia la colocalización ACh-nNOS en numerosas varicosidades. Barra= 50 μ m.

b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)

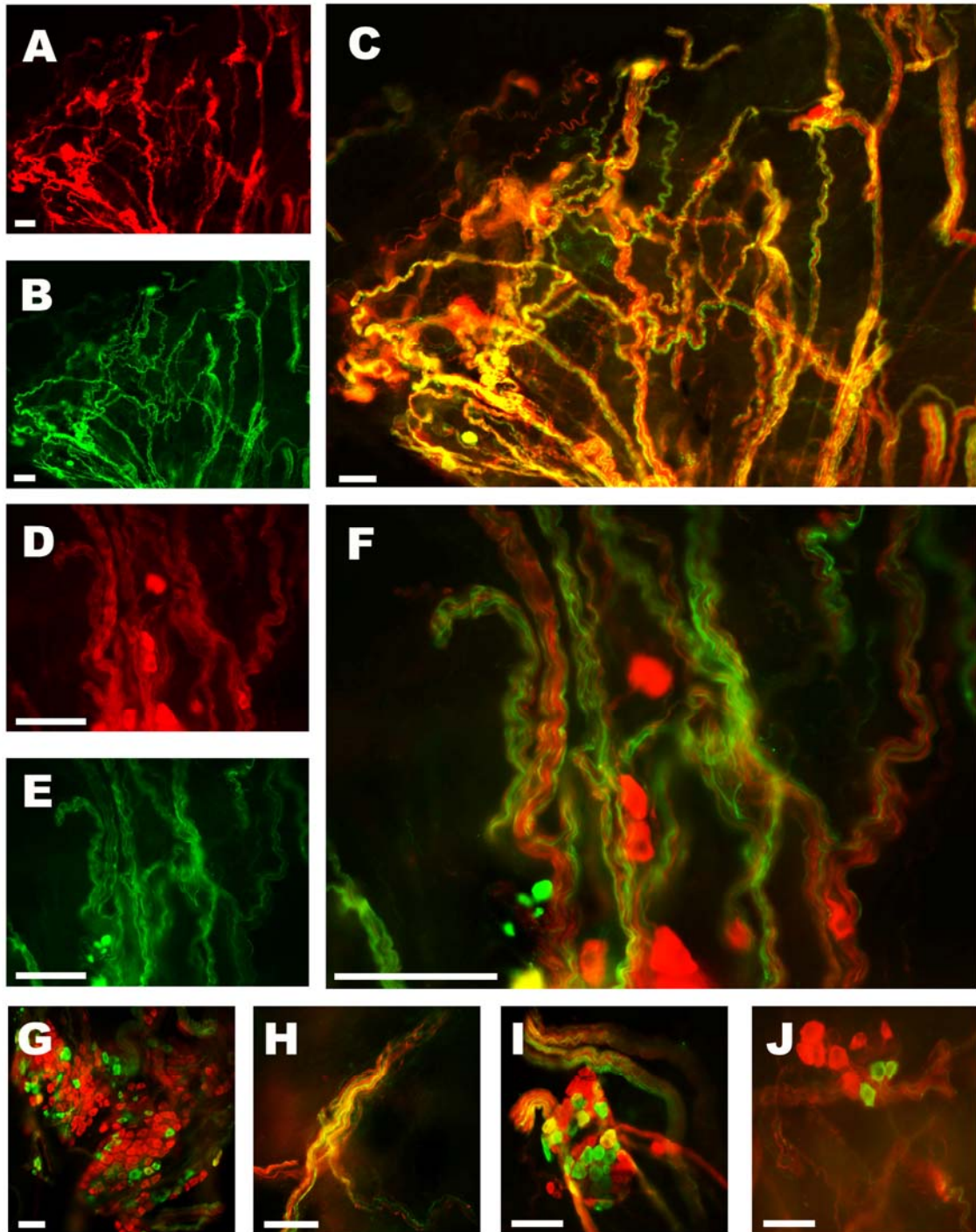


Figura 67. Doble marcaje a TSH (verde) y nNOS (rojo) en preparaciones *whole-mount* de capa muscular de vejiga SAM-R1 y SAM-P8. Se puede apreciar como en algunos casos existe un alto nivel de colocalización de ambos marcadores (**A-C**, **H**, **I**) y en otros los dos marcadores aparecen independientemente en distintas fibras y células nerviosas (**D-F**, **G**, **J**). **A**, **B**, **C** e **I**: Trígono de macho SAM-R1. **D**, **E** y **F**: Trígono de macho SAM-P8. **G**: Ganglios intramurales en trígono de macho SAM-P8. **H**: Trígono de hembra SAM-P8. **J**: Cúpula de hembra SAM-R1. Barra= 50 μ m.

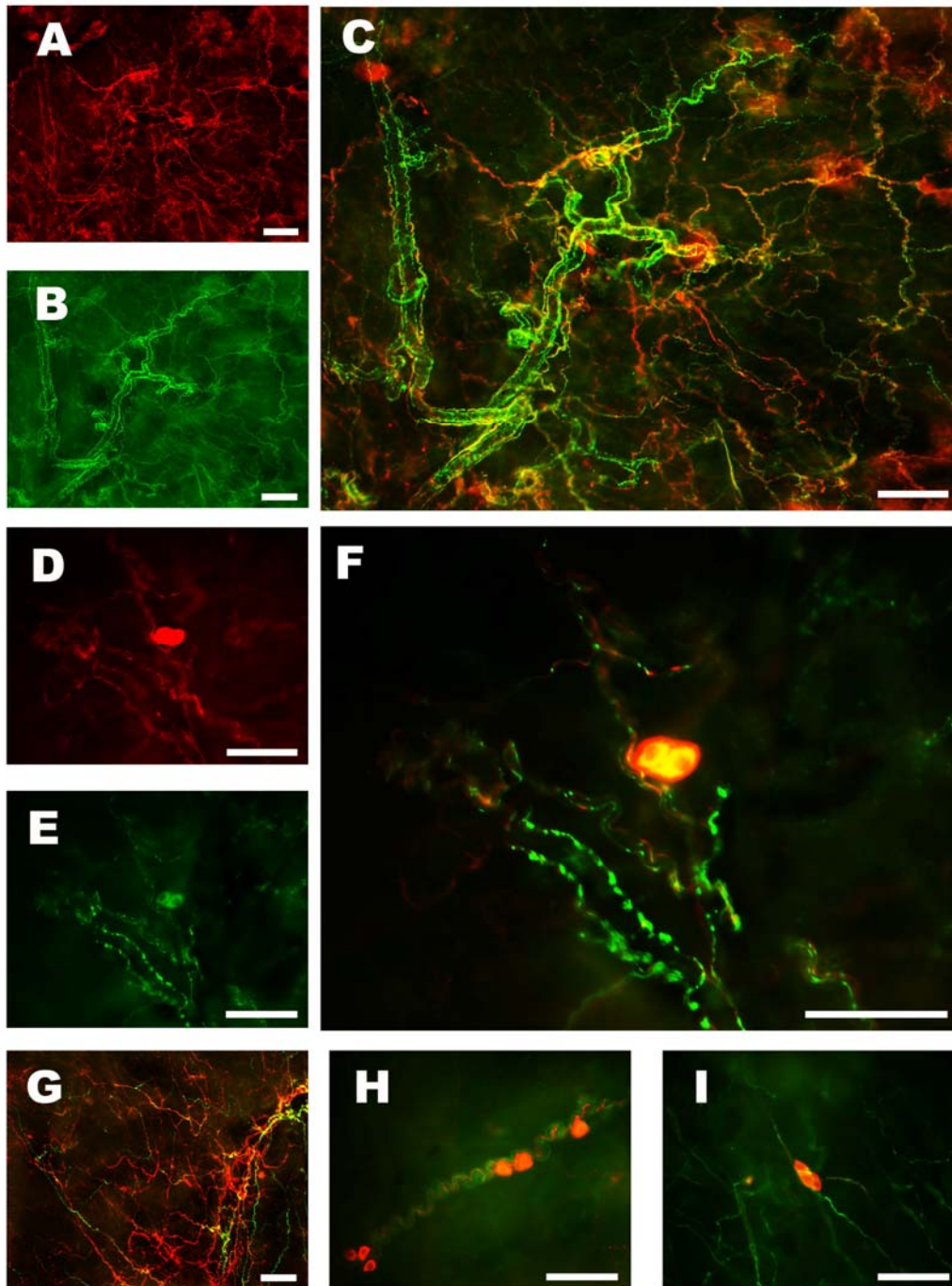


Figura 68. Doble marcaje a TSH (verde) y nNOS (rojo) en preparaciones *whole-mount* de lámina propia de vejiga SAM-R1 y SAM-P8. **A**, **B** y **C**: Trígono de hembra SAM-R1. En algunas zonas los dos marcadores discurren de forma paralela mientras que en otras colocalizan en la misma fibra. Lo mismo se observa en **G**: Detrusor de macho SAM-P8. Destaca en **A-C** un vaso ramificado que cruza el campo rodeado de fibras nerviosas adrenérgicas perivasculares. **D-F**: Trígono de hembra SAM-P8, se aprecia a mayores aumentos un ganglio intramural inmunorreactivo a ambos marcadores mientras que en las terminaciones nerviosas no hay colocalización. **H** e **I**: Trígono de macho SAM-R1. En ambos casos se observan fibras adrenérgicas procedentes de ganglios positivos a nNOS. Barra = 50 μ m.

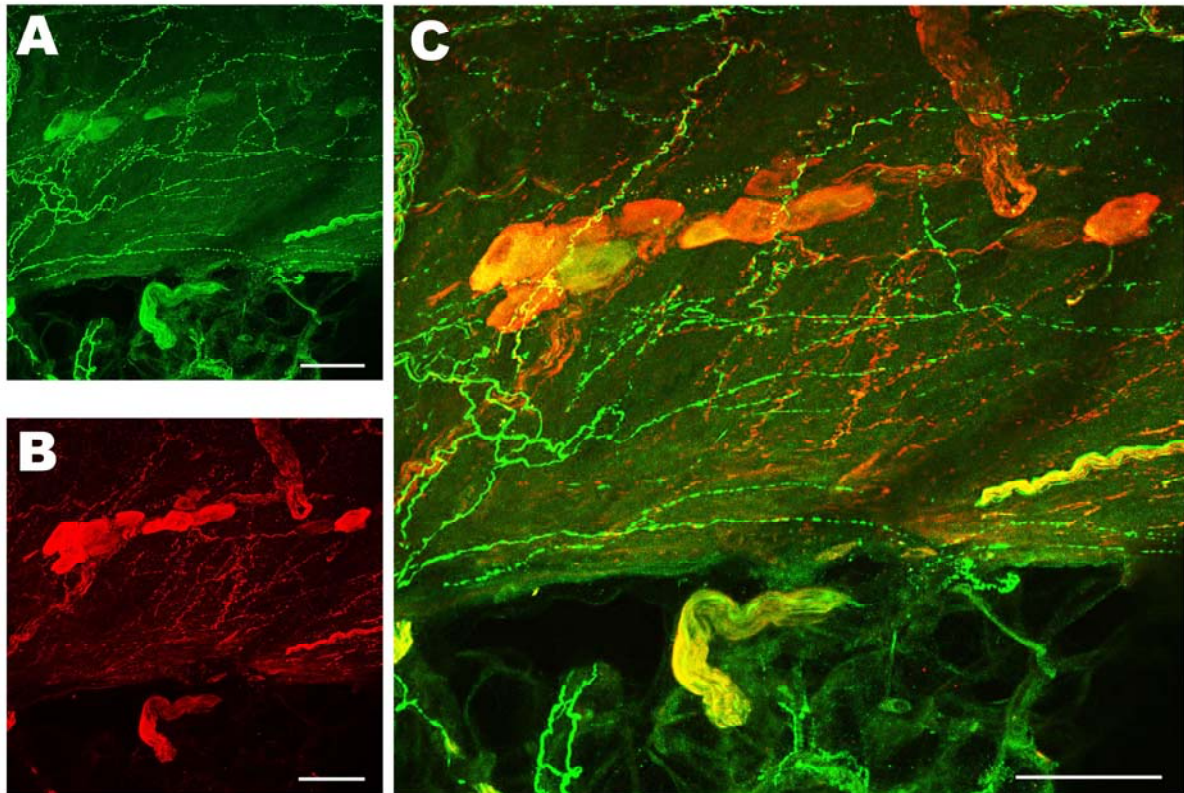


Figura 69. Imágenes de microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de capa muscular de trigono de vejiga de hembra SAM-R1. Se realizó un doble marcaje de TSH (verde) y nNOS (rojo). Se muestra la proyección Z de 65 planos de 2 μm cada uno. Se observa la densa inervación adrenérgica paralela en algunos puntos a la nitrérgica y la colocalización de ambos marcadores en algunas células ganglionares y troncos nerviosos. Barra= 25 μm .



Vejiga hembra SAM-P8.avi

Figura 70. Vídeo donde se aprecia la reconstrucción 3D de 53 planos de 2 μm cada uno obtenidos con microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de capa muscular de trigono de vejiga de hembra SAM-P8. Se realizó un doble marcaje de TSH (verde) y nNOS (rojo). Se observa la densa inervación adrenérgica paralela a la nitrérgica y la colocalización de ambos marcadores en algunas células ganglionares.

4.2.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs

a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)

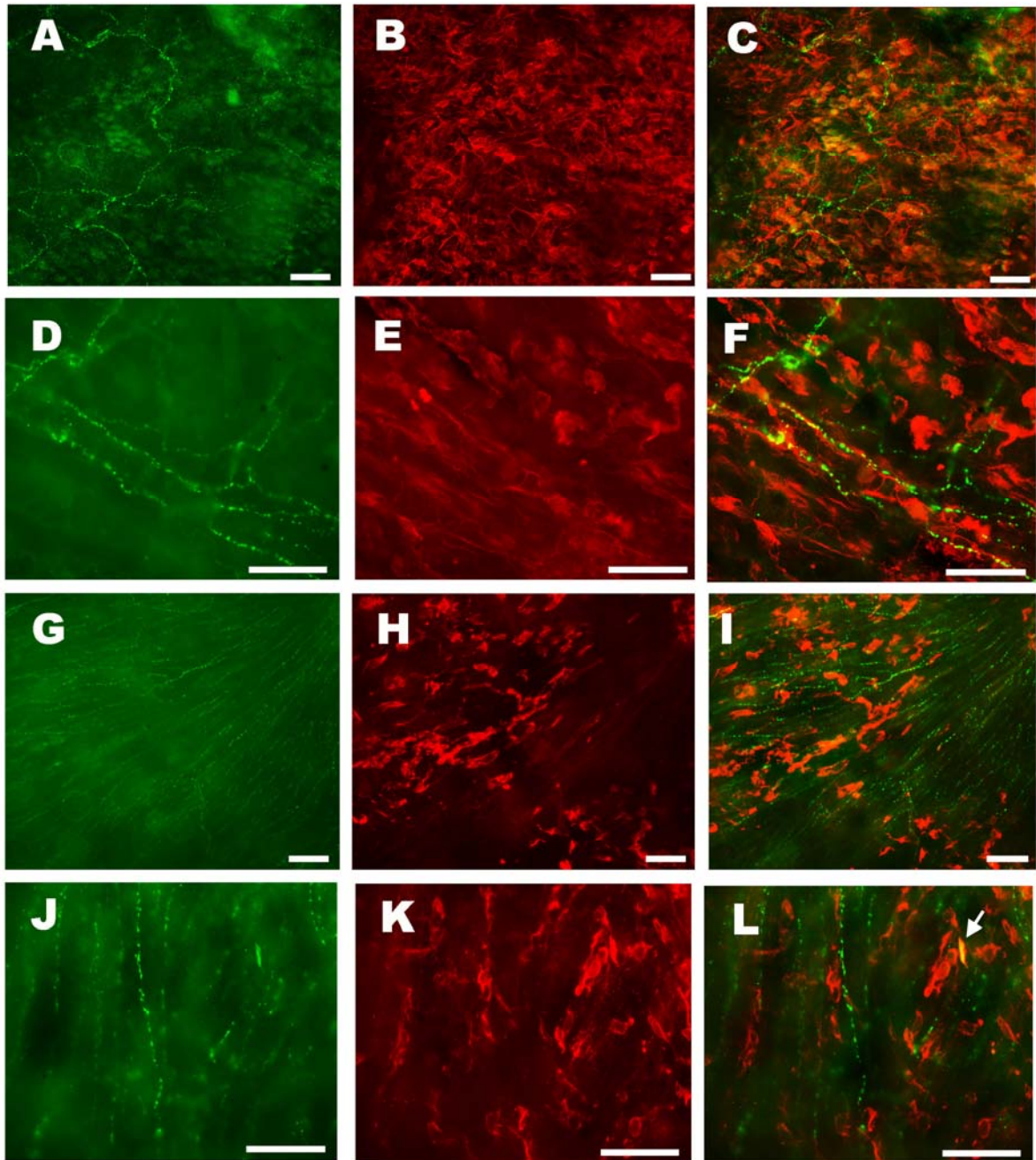
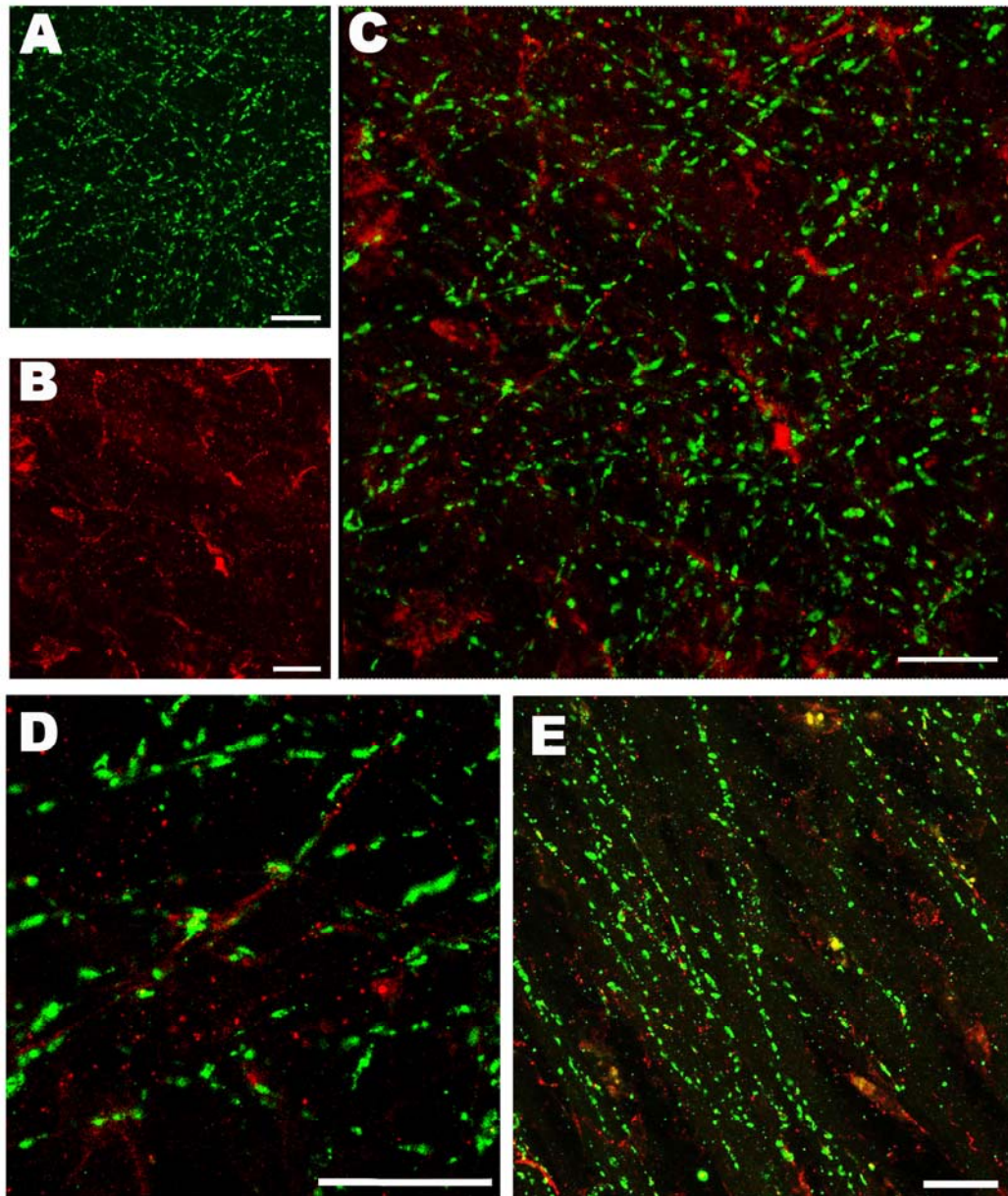


Figura 71. Doble marcaje de VACHT (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de trígono de vejiga SAM-R1 y SAM-P8. **A, B y C:** Lámina propia de macho SAM-P8 donde se observa la presencia de ACh en nervios y en el epitelio (al fondo) cubierto por ICCs subepiteliales estrelladas muy próximas a los nervios colinérgicos. **D, E y F:** Lámina propia de hembra SAM-R1, se puede apreciar la disposición perivascular de ambos marcadores. **G, H e I:** Capa muscular de hembra SAM-R1 y **J, K y L:** Capa muscular de macho SAM-P8 mostrando en ambos casos la distribución paralela y próxima de nervios colinérgicos e ICCs intramusculares fusiformes. Barra= 50 μ m.



F. Vejiga macho SAM-P8.avi

Figura 72. Imágenes (A-E) y vídeo de la reconstrucción 3D de imágenes (F) de microscopía confocal de preparaciones *whole-mount* de capa muscular de trigono de vejiga de machos SAM-P8. Se ha realizado un doble marcaje de VACHT (verde) y vimentina (rojo). A, B y C. Se muestra la proyección Z de 30 planos de 2 μ m cada uno. Se observa la distribución de fibras colinérgicas entre una densa red de ICC positivas a vimentina de forma fusiforme. En A y C se aprecian claramente las varicosidades nerviosas conteniendo el neurotransmisor. D y E. Las imágenes representan la proyección Z de 10 planos de 2 μ m cada uno. En D se puede apreciar a mayores aumentos contacto entre la varicosidades nerviosas y las ICCs. En E se observa como tanto las terminaciones nerviosas como las ICCs siguen el curso de los haces musculares. F. Reconstrucción 3D de 10 planos de la misma preparación (2 μ m cada uno) donde se aprecia la disposición descrita en D a menores aumentos. Barra= 10 μ m.

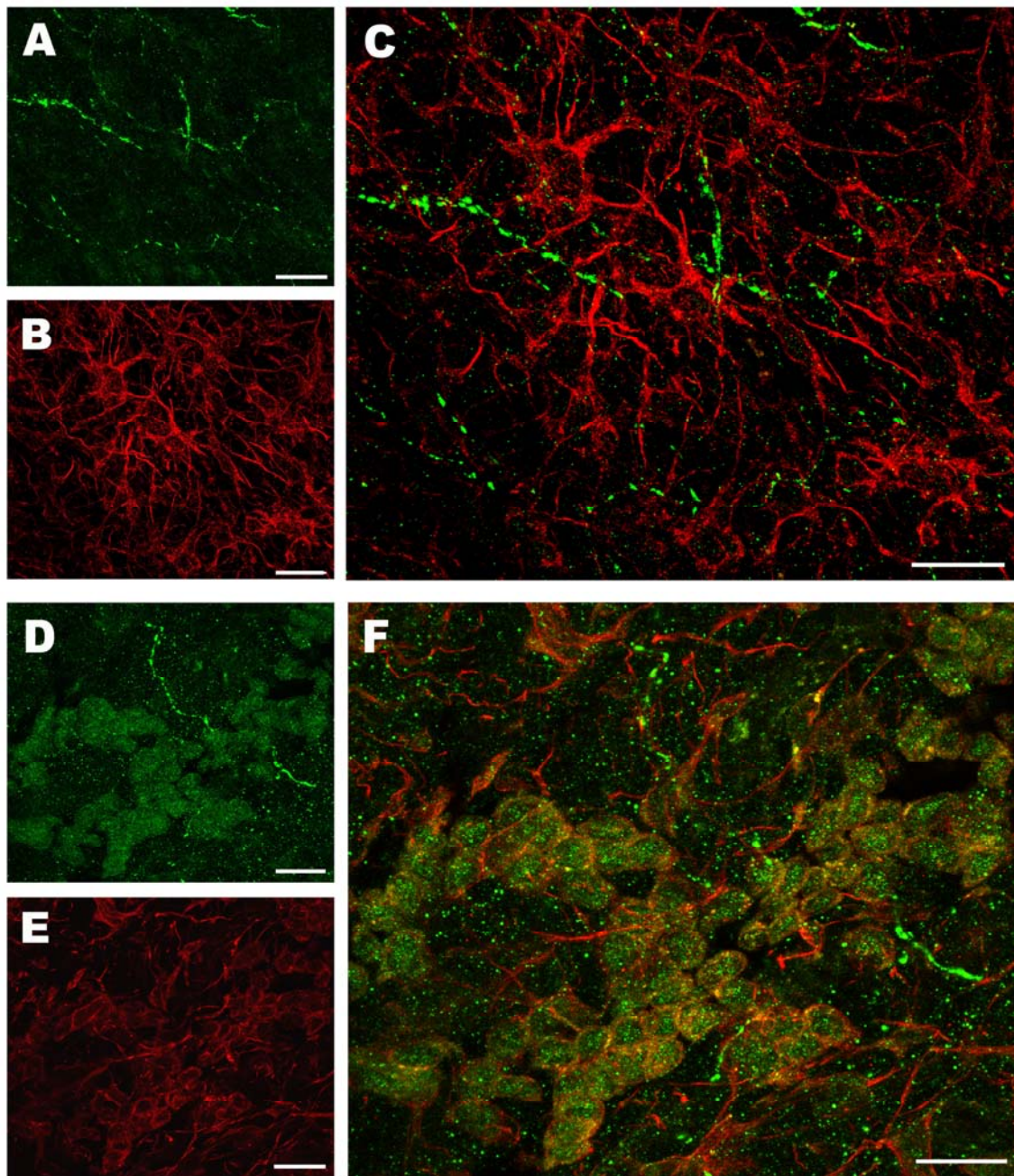


Figura 73. Imágenes de microscopía confocal de preparaciones *whole-mount* de lámina propia de trigono de vejiga de machos SAM-P8. Se ha realizado un doble marcaje de VAcHT (verde) y vimentina (rojo). **A**, **B** y **C**. Se muestra la proyección Z de 30 planos de 2 μm cada uno. Se observa la distribución de fibras colinérgicas entre una densa red de ICCs positivas a vimentina de forma estrellada. **D**, **E** y **F**. Se muestra la proyección Z de 6 planos de 2 μm cada uno donde se aprecia la distribución de las prolongaciones de las ICCs colocándose entre células epiteliales inmunorreactivas a ACh. Barra= 10 μm .

b) Noradrenalina (TSH)-ICCs (Vimentina)

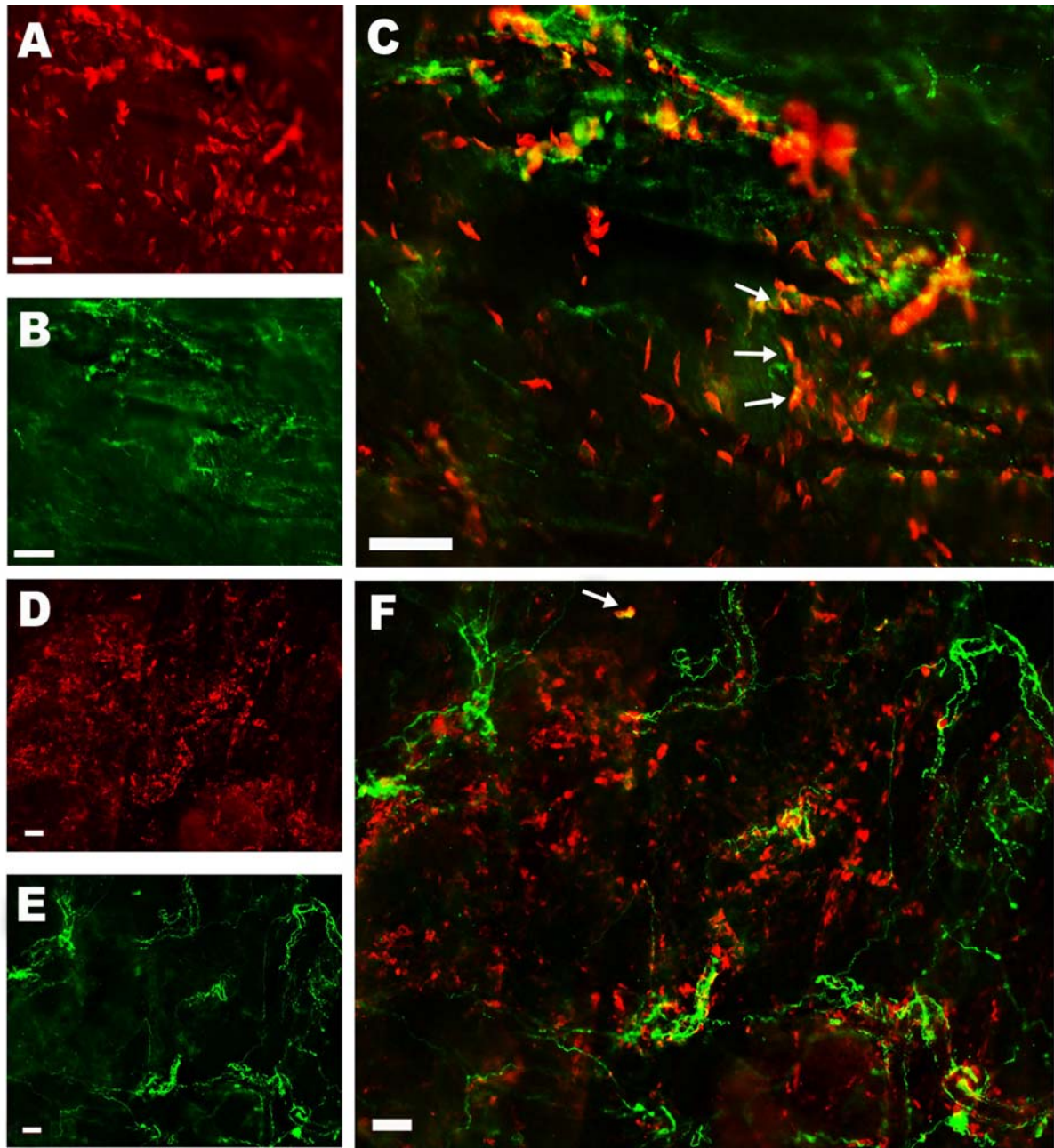


Figura 74. Doble marcaje a TSH (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de trigono de vejiga SAM-R1 y SAM-P8. **A, B y C:** Capa muscular de macho SAM-P8. **D, E y F:** Lámina propia de macho SAM-R1. Se muestra la presencia de nervios adrenérgicos intramurales entre una densa red de ICCs. Las flechas denotan algunas ICCs inmunorreactivas a los dos marcadores. Barra= 50 μ m.

4.3. URETRA

4.3. URETRA: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 hembras en comparación con SAM-R1

4.3.1. Cambios estructurales

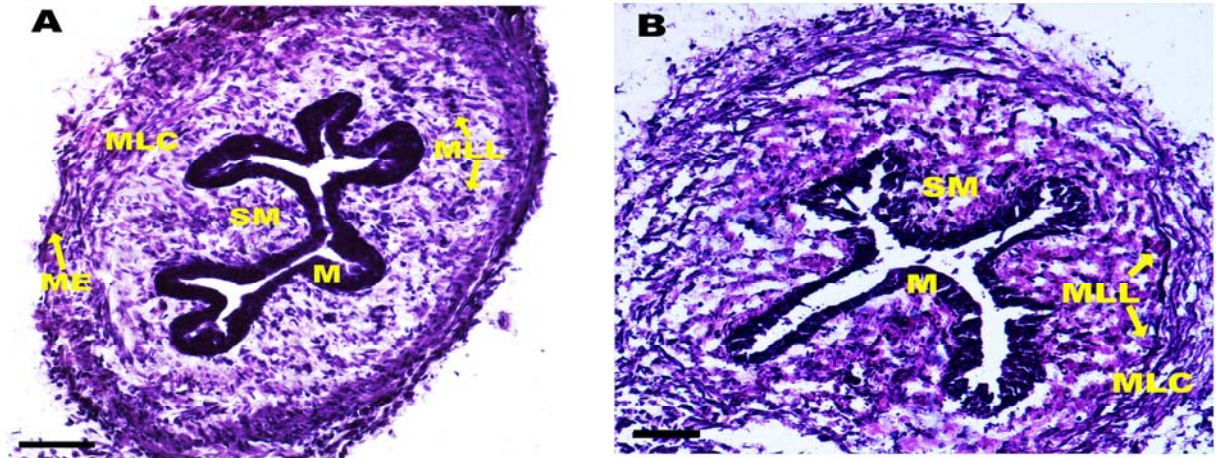


Figura 75. Microfotografías de cortes transversales (10µm) de uretra proximal teñidos con H&E. **A.** Hembra SAM-R1. **B.** Hembra SAM-P8. M: mucosa, SM: lámina propia, MLC: músculo liso circular, MLL: músculo liso longitudinal, ME: músculo estriado. Barra = 100 µm.

4.3.2. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por una alta concentración de K^+ extracelular

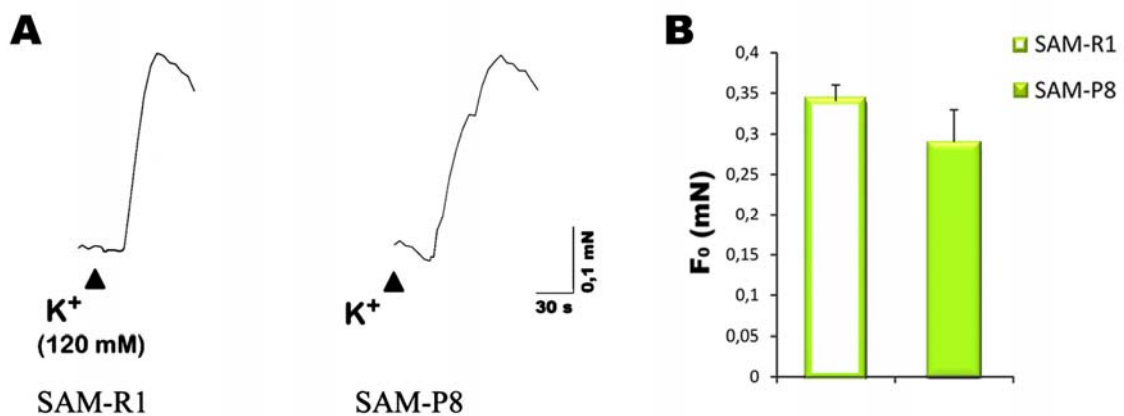


Figura 76. Registros representativos (**A**) y valores medios (**B**) de la respuesta contráctil inducida por K^+ (120 mM) en preparaciones longitudinales de músculo liso de uretra de hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores medios están expresados como media \pm error estándar de la media ($n=13-16$).

4.3.3. Diferencias en la contractilidad uretral inducida por EFS y por agonistas exógenos

4.3.3.1. Contracción

4.3.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS

a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8

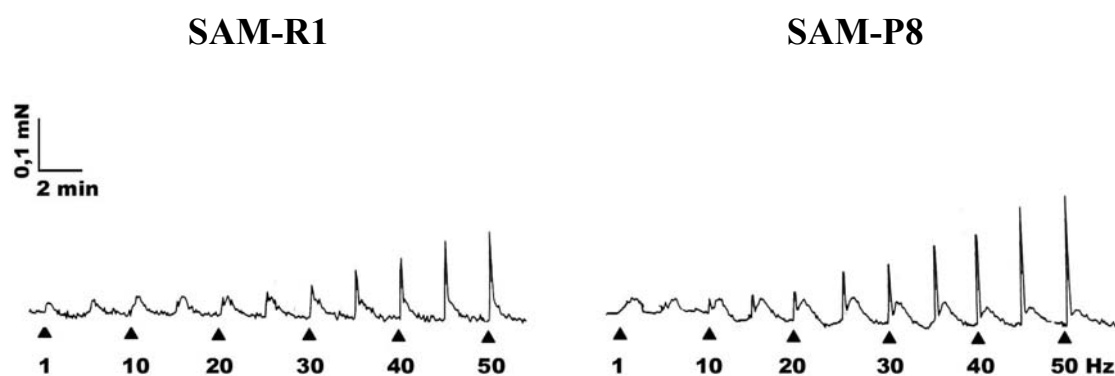


Figura 77. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de uretra hembra SAM-R1 y SAM-P8.

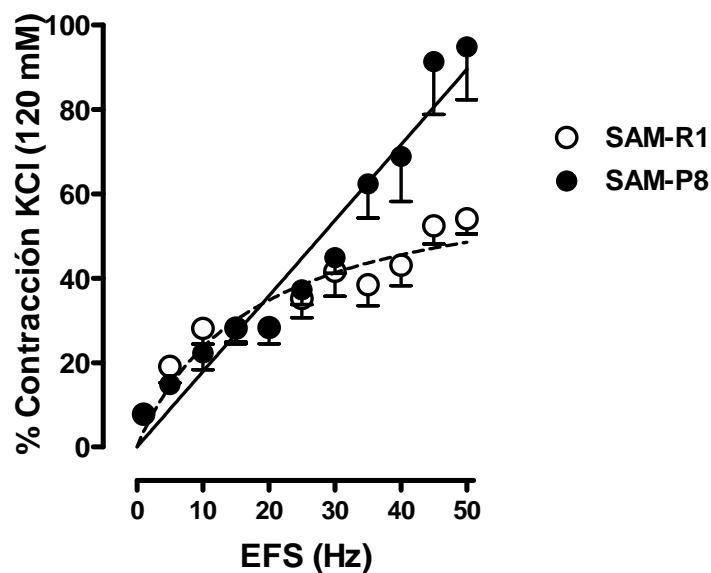


Figura 78. Curva frecuencia-respuesta inducida por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 10-13$).

b) Mediadores implicados

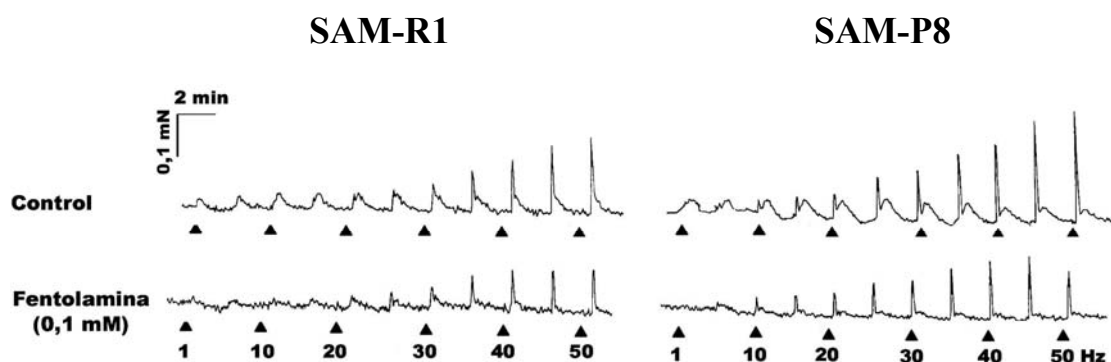


Figura 79. Registros representativos que muestran el efecto de la Fentolamina (0,1 mM) en la respuesta contráctil inducida por EFS (1-50 Hz) en tiras longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8.

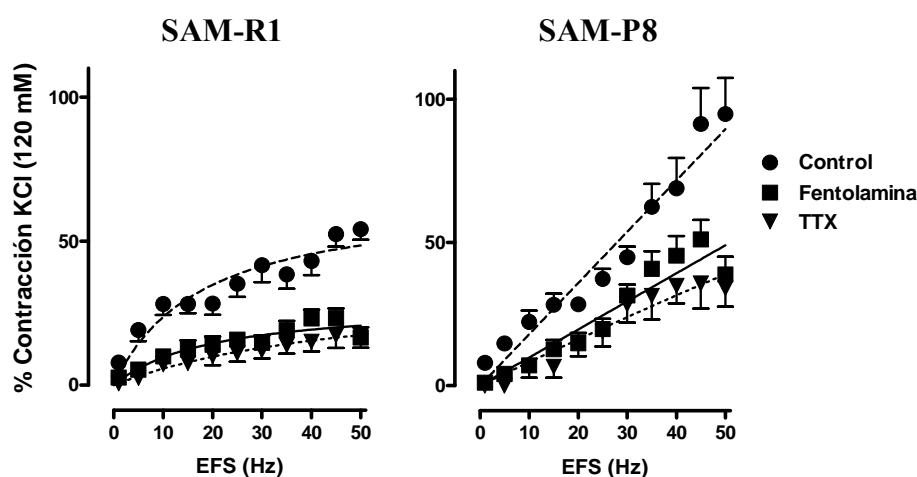


Figura 80. Curvas frecuencia-respuesta que muestran el efecto de la preincubación (30 min) con Fentolamina (0,1 mM) y con TTX (1 μ M) sobre la contracción inducida por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 4-13$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	EF ₅₀	E _{max}	<i>n</i>	EF ₅₀	E _{max}	<i>n</i>
Control	23,6 \pm 3,4	55,9 \pm 4,4 (50 Hz)	10	28,6 \pm 2,1	94,7 \pm 12,5 * (50 Hz)	13
Fentolamina (0,1mM)	18,8 \pm 2,9	22,3 \pm 3,4 ^{##} (45 Hz)	9	24,7 \pm 1,9	43,4 \pm 6,1 ^{##} * (45 Hz)	10
TTX (1μM)	21,3 \pm 3,1	17,5 \pm 4,5 ^{##} (45 Hz)	4	19,9 \pm 1,9	35,6 \pm 8,7 ^{##} * (45 Hz)	4

Tabla 9. Valores de la potencia (EF₅₀) y de la respuesta máxima (E_{max}) de la relación frecuencia-respuesta de contracción en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 en condiciones control y en presencia de Fentolamina (0,1 mM) y TTX (1 μ M). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n = 4-13$). * $p < 0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y ^{##} $p < 0,01$ respecto a la respuesta control.

4.3.3.1.2 Respuesta contráctil inducida por NA

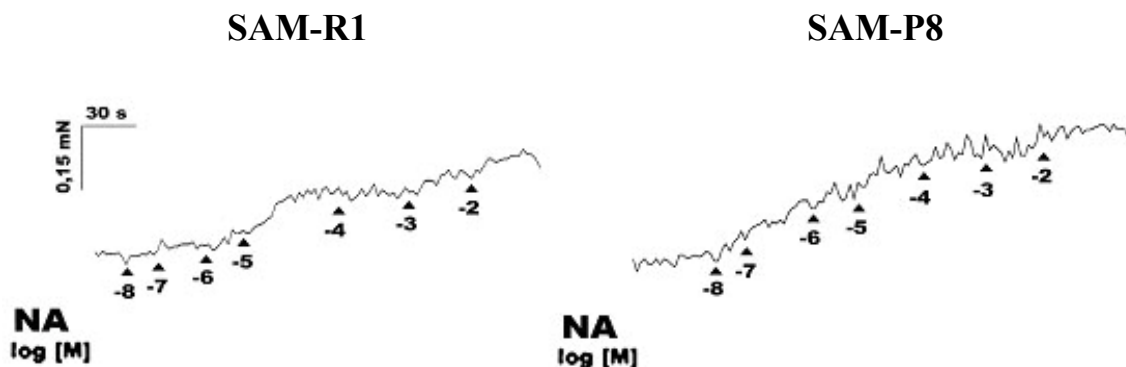


Figura 81. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por la adición acumulativa (10^{-8} a 10^{-2} M) de NA exógena en tiras longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

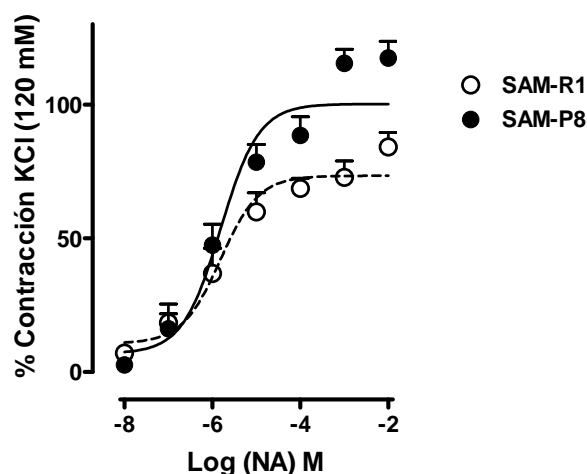


Figura 82. Curva dosis-respuesta inducida por NA (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones uretrales de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=10-11$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	<i>n</i>	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	<i>n</i>
NA	5,4 \pm 0,4	76,1 \pm 7,3	10	5,7 \pm 0,2	116,6 \pm 11,7 *	11

Tabla 10. Valores de la potencia (pEC₅₀) y de la respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta inducida por NA (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones uretrales de hembras SAM-R1 y SAM-P8, y expresados como media \pm error estándar de la media ($n=10-11$). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

4.3.3.2. Relajación

4.3.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS

a) Diferencias entre hembras SAM-R1 y SAM-P8

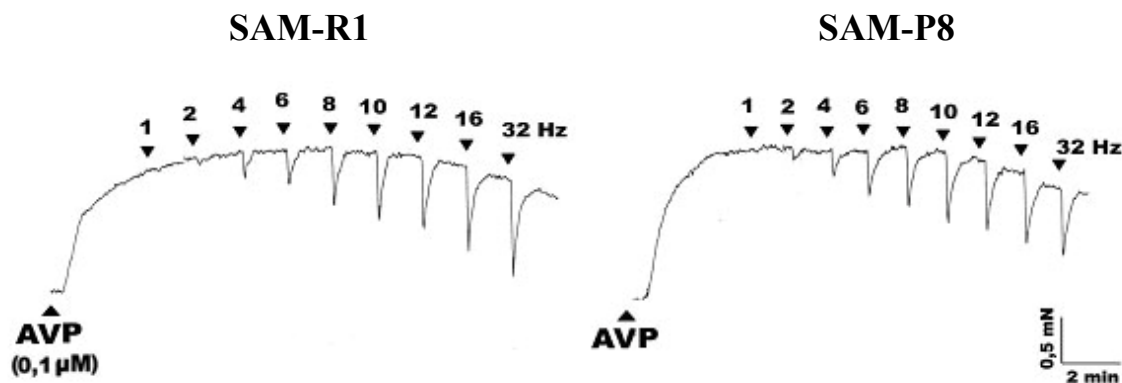


Figura 83. Registro representativo de la respuesta relajante inducida por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de uretra hembra SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con arginina-vasopresina (AVP; 0,1 μ M).

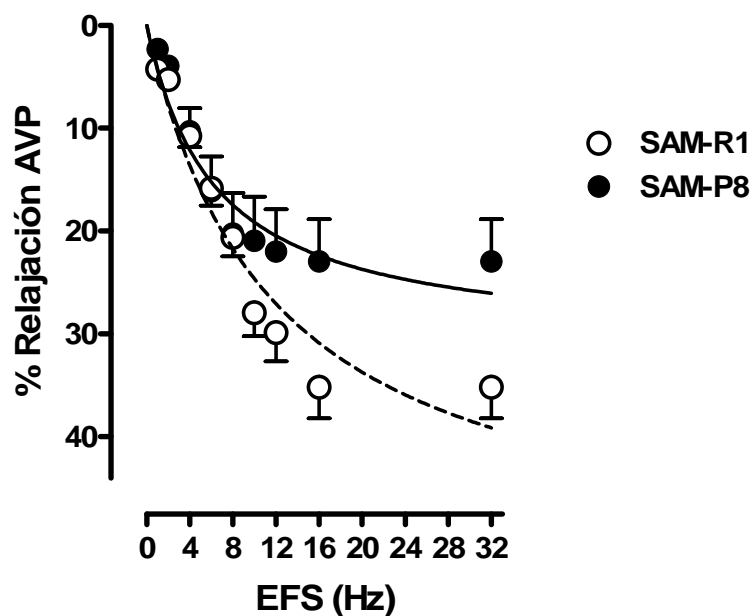


Figura 84. Curva frecuencia-respuesta inducida por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 14-16$).

b) Mediadores implicados

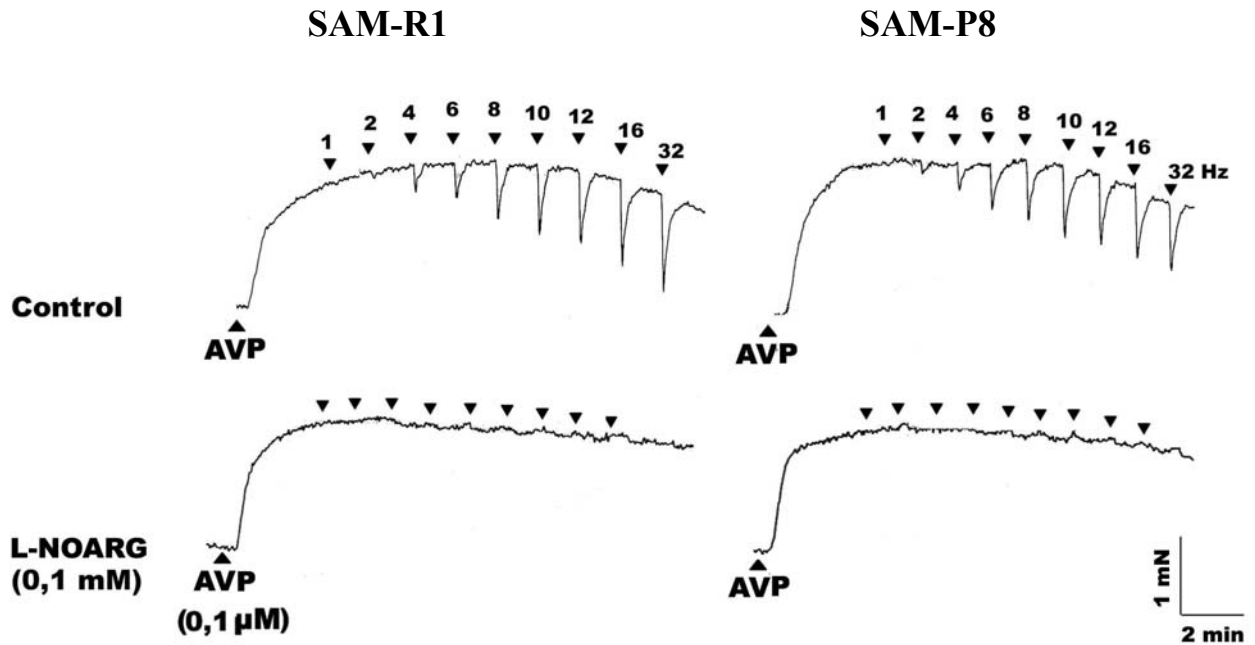


Figura 85. Registro representativo del efecto de la inhibición de la NOS con L-nitro-arginina (L-NOARG; 0,1 mM; 30 min) sobre la respuesta relajante inducida por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M). Respuesta control en la parte superior y después del tratamiento con L-NOARG en la parte inferior.

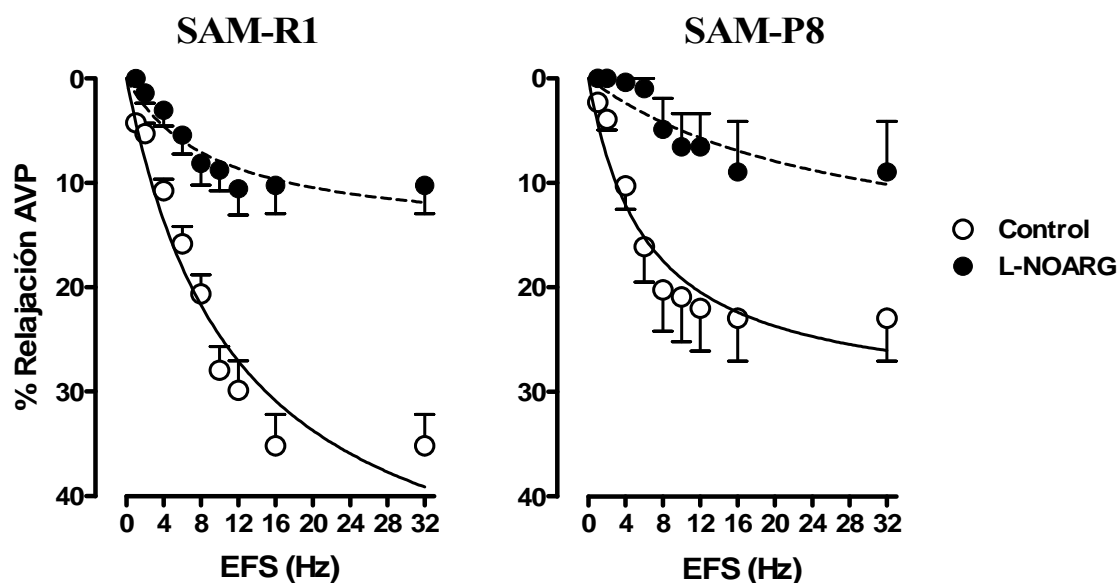


Figura 86. Curvas frecuencia-respuesta inducidas por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M) y efecto del pretratamiento con L-NOARG (0,1 mM) sobre las mismas. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 6-16$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	EF ₅₀	E _{max}	<i>n</i>	EF ₅₀	E _{max}	<i>n</i>
Control	6,4 \pm 0,4	35,2 \pm 3,0 (16 Hz)	16	5,9 \pm 0,6	22,9 \pm 4,1* (16 Hz)	14
L-NOARG (0,1 mM)	5,0 \pm 1,0	11,3 \pm 2,8 ^{###} (16 Hz)	12	3,9 \pm 1,5	7,7 \pm 4,3 [#] (16 Hz)	6

Tabla 11. Valores de la potencia (EF₅₀) y de la respuesta máxima (E_{max}) de la relación frecuencia-respuesta de relajación en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M) en condiciones control y en presencia de L-NOARG (0,1 mM). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n = 6-16$). * $p < 0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y [#] $p < 0,05$ y ^{###} $p < 0,001$ respecto a la respuesta control.

4.3.3.2.2. Relajación inducida por DEA/NO

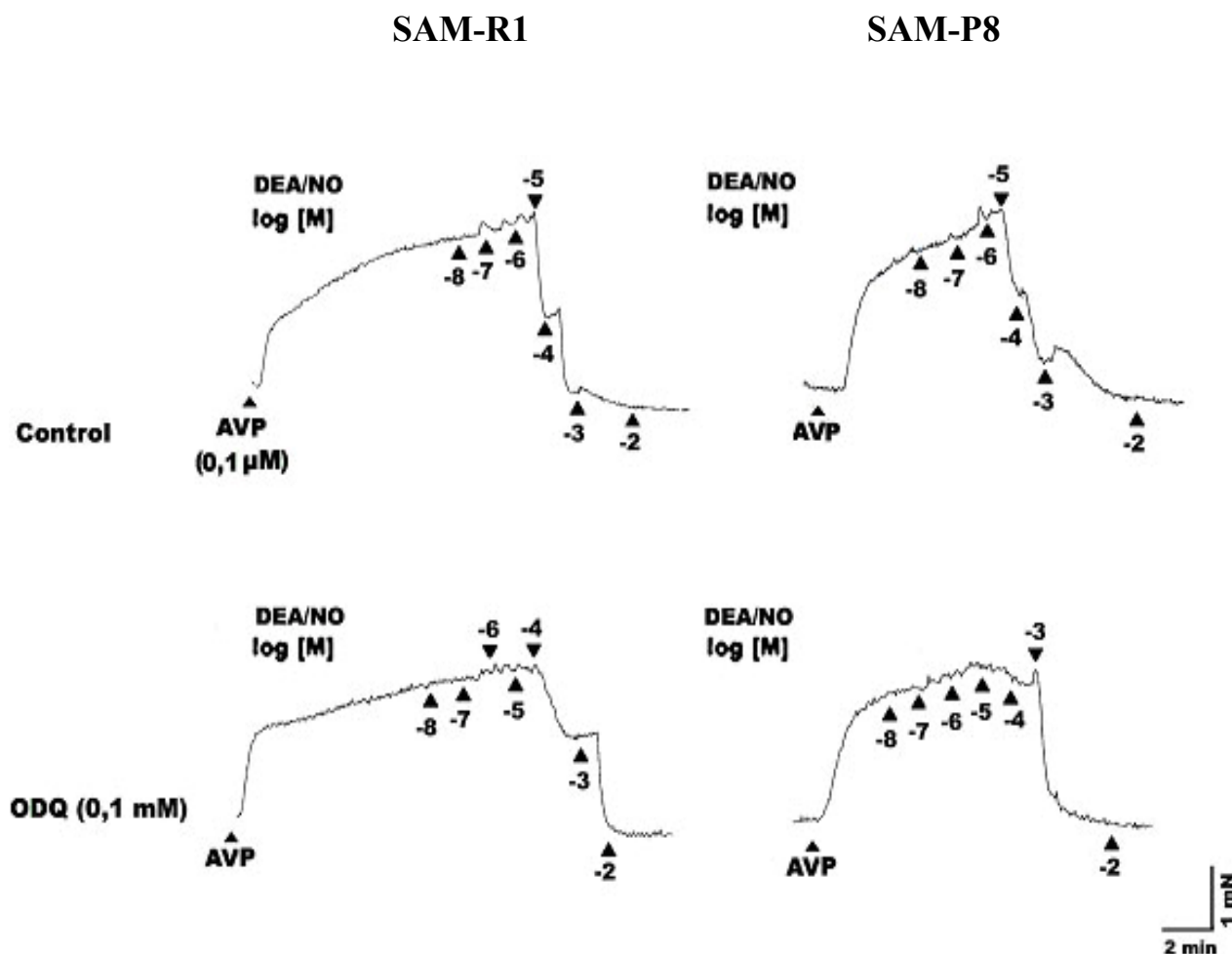


Figura 87. Registro representativo mostrando la respuesta relajante inducida por la adición de DEA/NO (10^{-8} a 10^{-2} M) en forma acumulativa y el efecto del antagonista de la guanilato ciclasa ODQ (0,1 mM; 30 min) en tiras longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μM). Respuesta control en la parte superior y preincubada con ODQ en la inferior. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

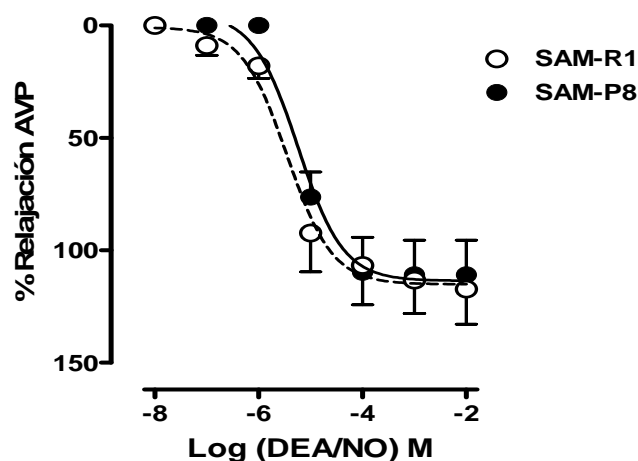


Figura 88. Curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de DEA/NO (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones uretrales de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP ($0,1 \mu\text{M}$). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=9-12$).

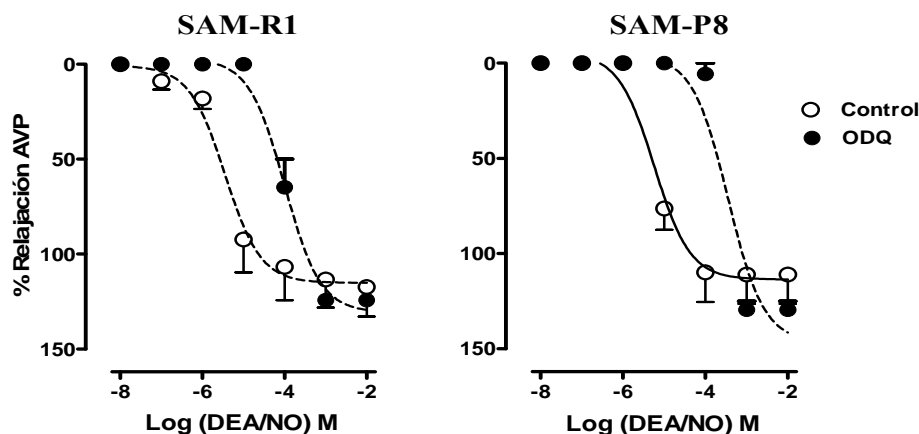


Figura 89. Curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de DEA/NO (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones uretrales de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP ($0,1 \mu\text{M}$) y el efecto del tratamiento con ODQ ($0,1 \text{ mM}$). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=4-12$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max}	n	pEC ₅₀	E _{max}	n
DEA/NO	4,9 \pm 0,2	113,7 \pm 14,7 (10^{-2} M)	12	5,2 \pm 0,1	111,0 \pm 15,4 (10^{-2} M)	9
DEA/NO + ODQ (0,1 mM)	3,6 \pm 0,3 ^{##}	124,3 \pm 2,6 (10^{-3} M)	4	3,0 \pm 0,1 ^{###}	129,6 \pm 4,6 (10^{-3} M)	4

Tabla 12. Valores de la potencia (pEC₅₀) y de la respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta inducida por DEA/NO (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP ($0,1 \mu\text{M}$), en condiciones control y en presencia de ODQ ($0,1 \text{ mM}$). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n=4-12$). ^{##}p<0,01 y ^{###}p<0,001 señala diferencias significativas respecto a la respuesta control.

4.3.3.2.3. Relajación inducida por Sildenafil

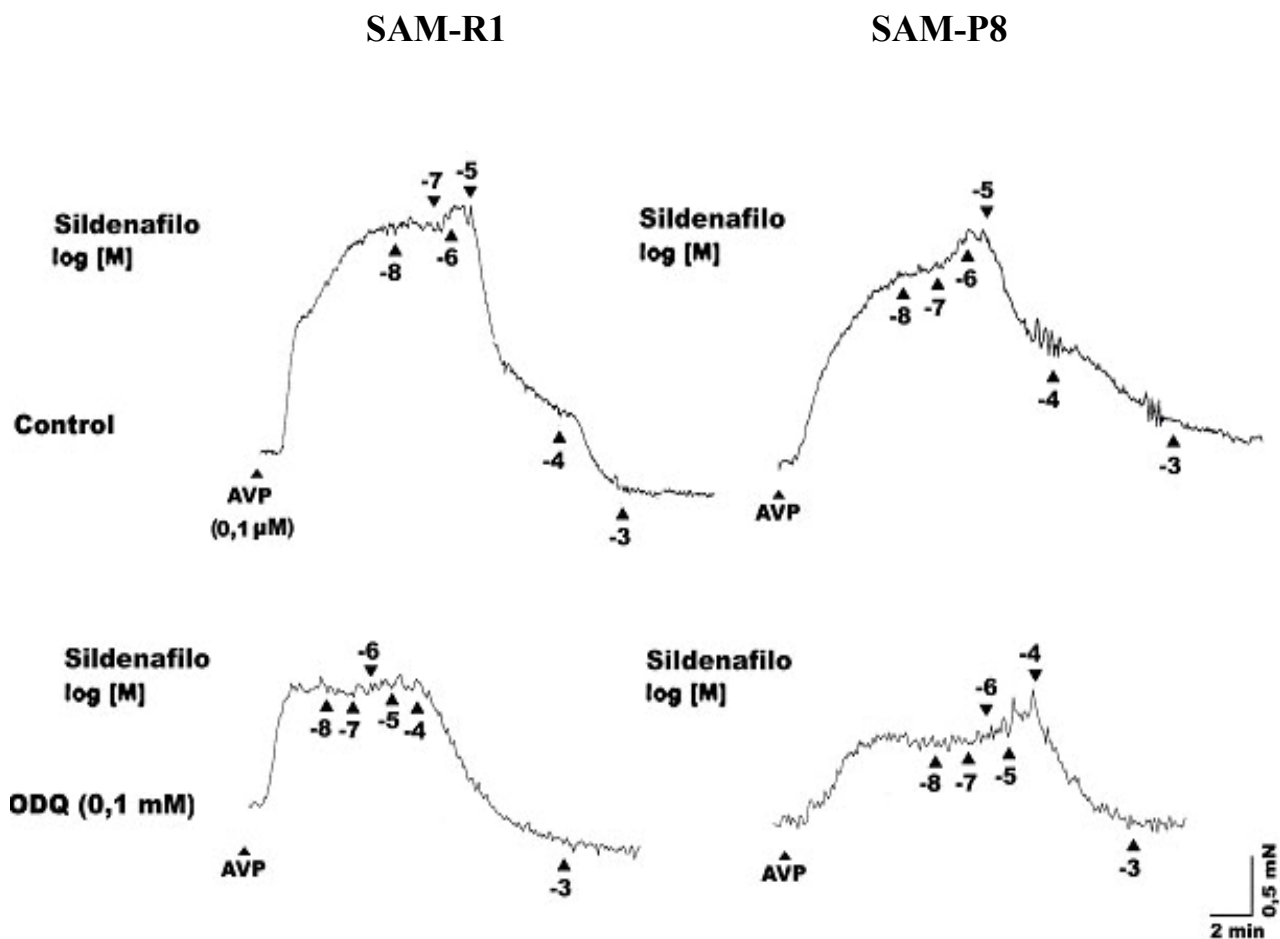


Figura 90. Registro representativo mostrando la respuesta relajante inducida por la adición de Sildenafil (10^{-8} a 10^{-3} M) en forma acumulativa y el efecto del antagonista de la guanilato ciclasa ODQ (0,1 mM; 30 min) en tiras longitudinales uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μM). Respuesta control en la parte superior y preincubada con ODQ en la inferior. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

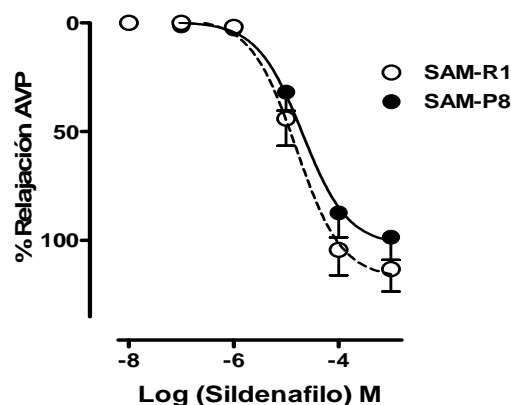


Figura 91. Curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de Sildenafil (10^{-8} M a 10^{-3} M) en preparaciones uretrales de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP ($0,1 \mu\text{M}$). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 7-13$).

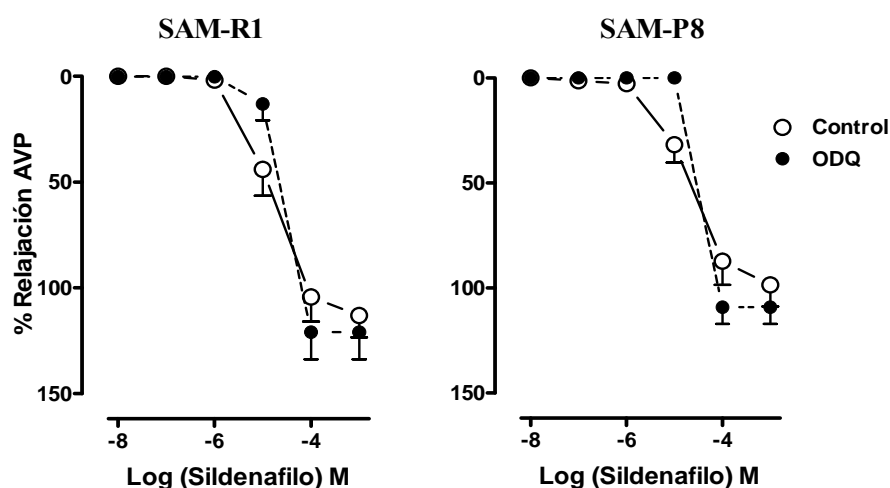


Figura 92. Efecto del ODQ sobre las curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de Sildenafil (10^{-8} M a 10^{-3} M) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP ($0,1 \mu\text{M}$). Las preparaciones fueron preincubadas con ODQ ($0,1 \text{ mM}$) durante 30 min. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 4-13$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n
Sildenafil	$4,6 \pm 0,1$	$113,2 \pm 10,2$	7	$4,6 \pm 0,1$	$98,5 \pm 10,4$	13
Sildenafil + ODQ (0,1 mM)	$4,2 \pm 0,1$ ^{###}	$121,0 \pm 12,8$	4	$4,1 \pm 0,1$ [#]	$109,2 \pm 7,9$	6

Tabla 13. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta inducida por Sildenafil (10^{-8} M a 10^{-3} M) en preparaciones longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP ($0,1 \mu\text{M}$), en condiciones control y en presencia de ODQ ($0,1 \text{ mM}$). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n = 4-13$). [#]p<0,05 y ^{###}p<0,01 señala diferencias significativas respecto a la respuesta control.

4.3.3.2.4. Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast

a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8

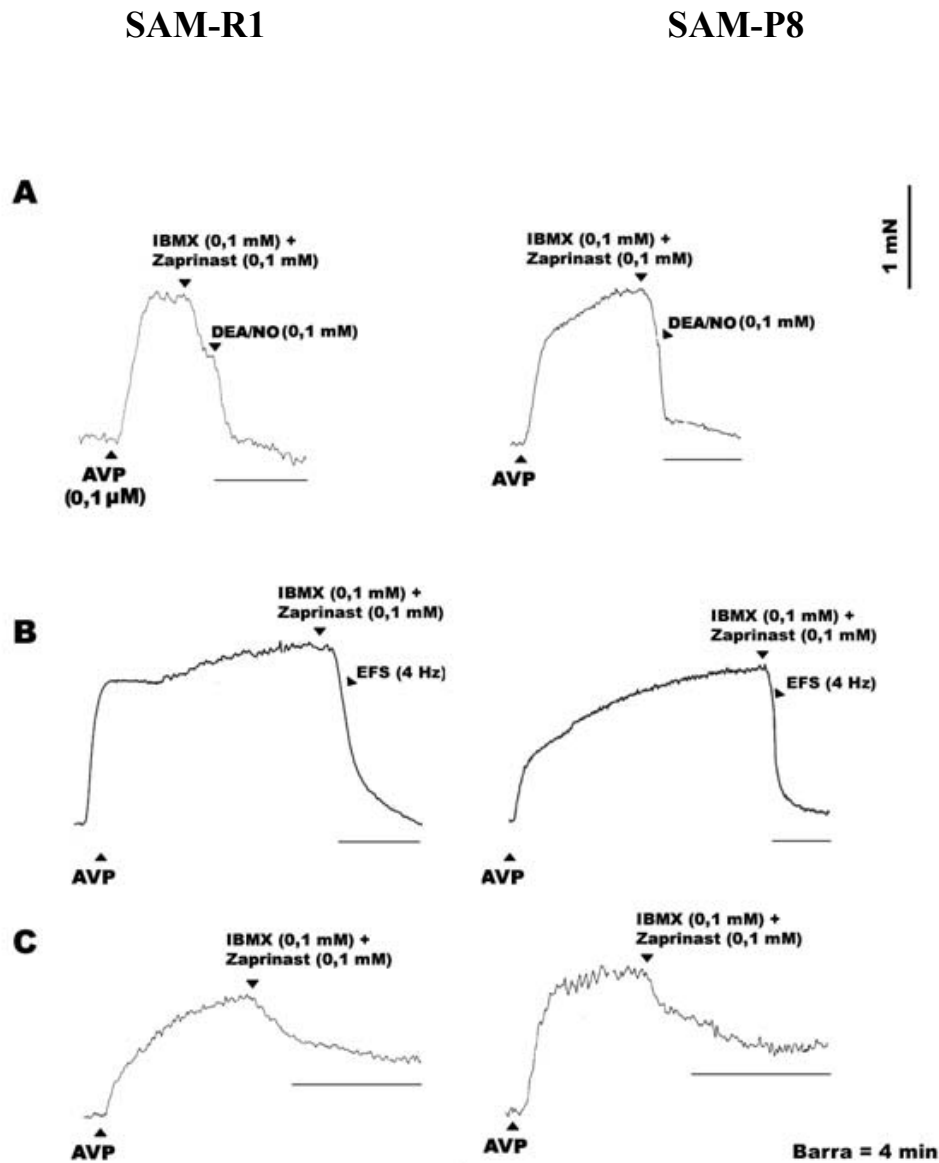


Figura 93. Registros representativos de las respuestas relajantes inducidas por estimulación continua durante 4 minutos con DEA/NO (0,1 mM) (A) o EFS (4 Hz) (B) en tiras longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μM) y en presencia de IBMX y zaprinast (ambos a 0,1 mM; 30 s antes). En C se muestra la relajación inducida por la adición exclusiva de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) durante 4 minutos.

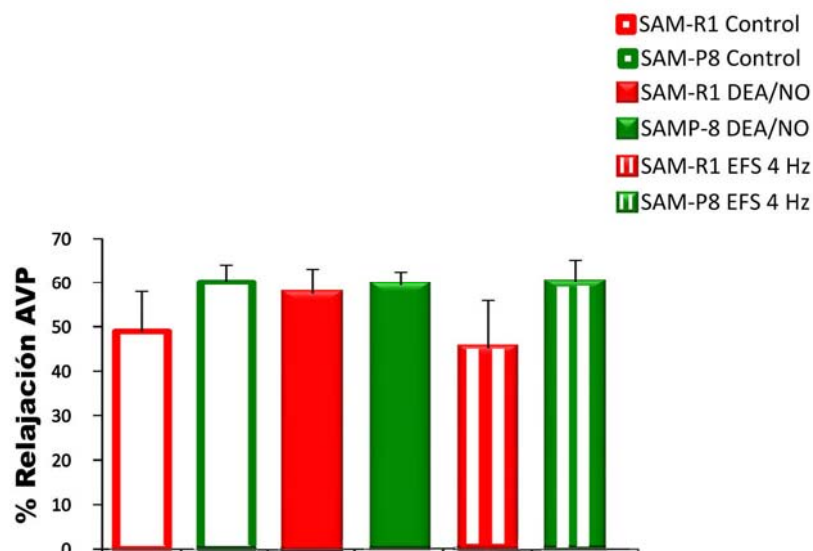


Figura 94. Valores medios de la relajación inducida por DEA/NO (0,1 mM) y EFS (4 Hz) durante 4 minutos en preparaciones de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M) y en presencia de IBMX (0,01 mM) y Zaprinast (0,01 mM). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan en porcentaje del nivel de precontracción previa inducido por AVP y se dan como media \pm error estándar de la media ($n=5-6$).

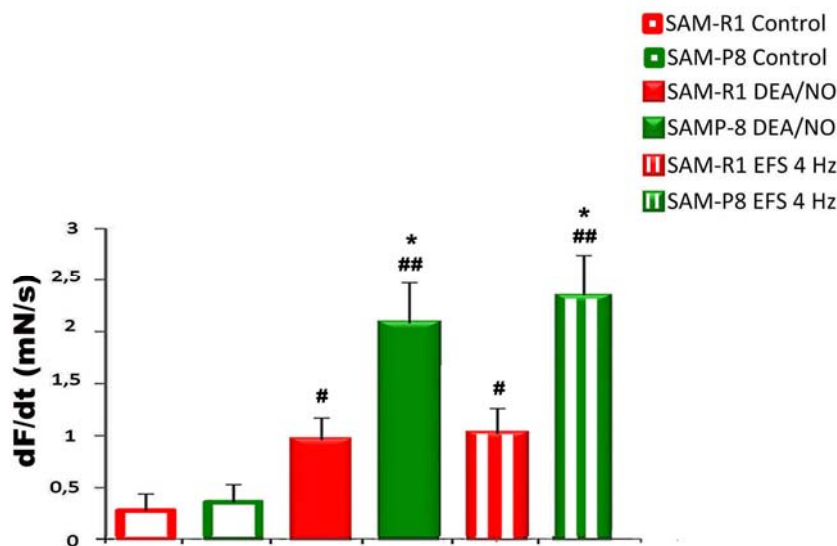


Figura 95. Pendiente (dF/dt) de las relajaciones inducidas durante 4 minutos por DEA/NO (0,1 mM) y EFS (4 Hz) en preparaciones de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M) y en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 5-6$). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y # $p<0,05$ y ## $p<0,01$ respecto al control.

b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)

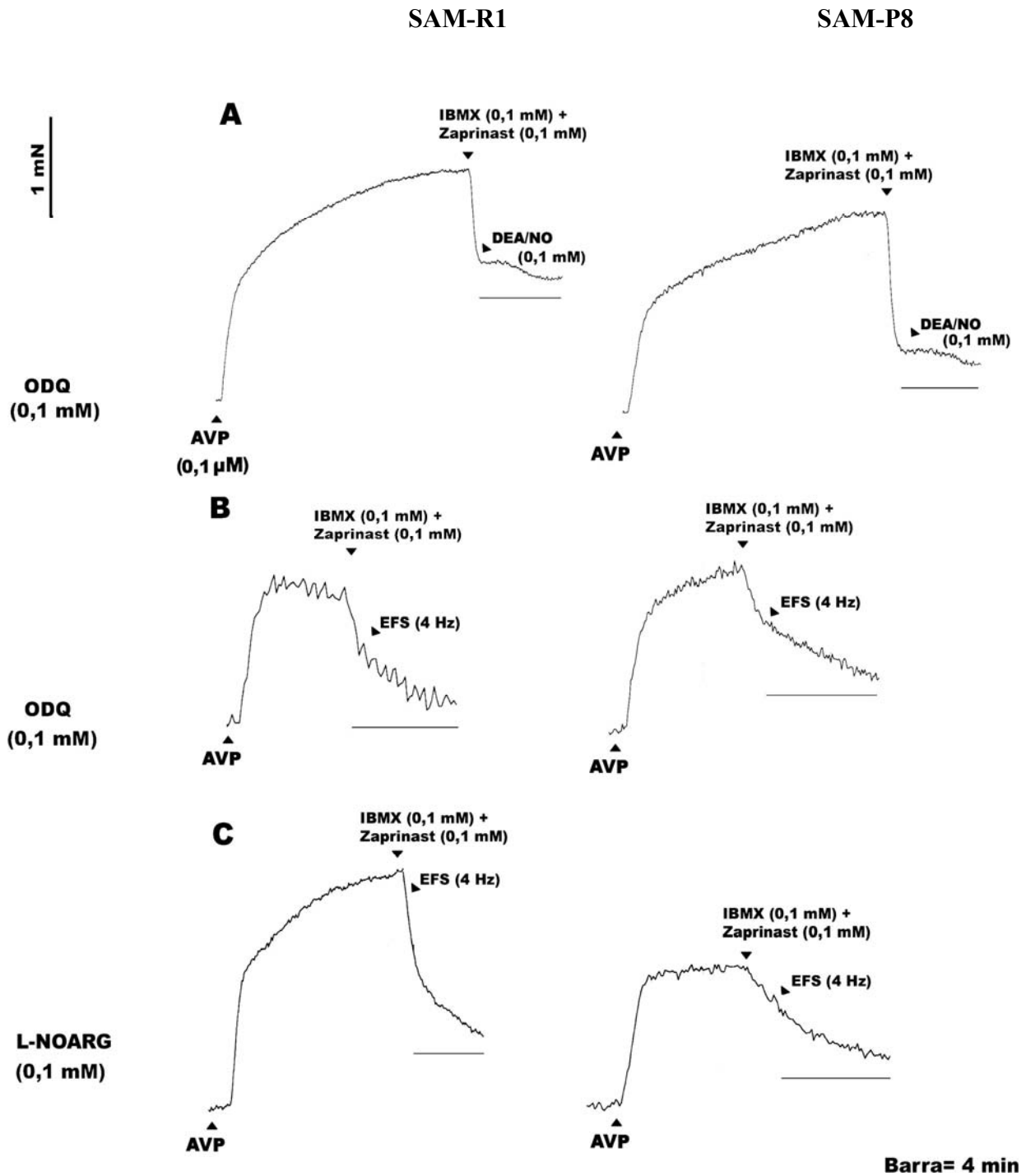


Figura 96. Registros representativos del efecto del pretratamiento con ODQ (0,1 mM; 30 min) o L-NOARG (0,1 mM; 30 min) sobre las respuestas relajantes inducidas durante 4 minutos con DEA/NO (0,1 mM) (A) o EFS (4 Hz) (B y C) en tiras longitudinales de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μM) y en presencia de IBMX y Zaprinast (0,1 mM; 30 s antes).

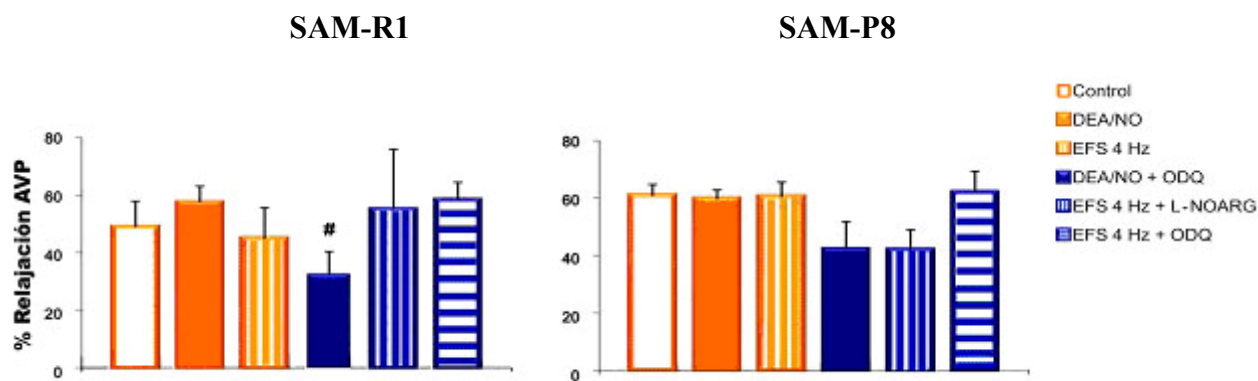


Figura 97. Valores medios de la relajación alcanzada a los 4 minutos por DEA/NO (0,1 mM) o EFS (4Hz) en preparaciones de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M) en presencia de IBMX y Zaprinast (0,1 mM; 30 s antes) y pretratados con ODQ o L-NOARG (0,1 mM; 30 min). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por la adición sólo de IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan en porcentaje del nivel de precontracción con AVP y como media \pm error estándar de la media ($n = 4-6$). [#]p<0,05 señala diferencias significativas respecto a DEA/NO.

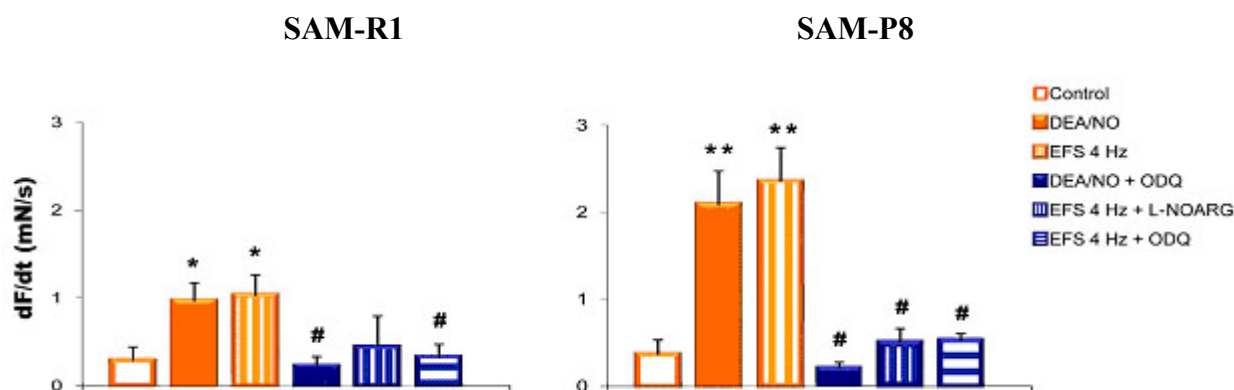


Figura 98. Pendiente (dF/dt) de las relajaciones inducidas durante 4 minutos por DEA/NO (0,1 mM) y EFS (4 Hz) en preparaciones de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μ M) en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) y pretratados con ODQ o L-NOARG (0,1 mM; 30 min). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por la adición solo de IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 4-6$). ^{*}p<0,05 y ^{**}p<0,01 señalan diferencias significativas respecto al control, y [#]p<0,05 respecto a EFS o DEA/NO en ausencia de pretratamiento.

4.3.4. Cambios en la densidad de innervación uretral

4.3.4.1. Innervación colinérgica

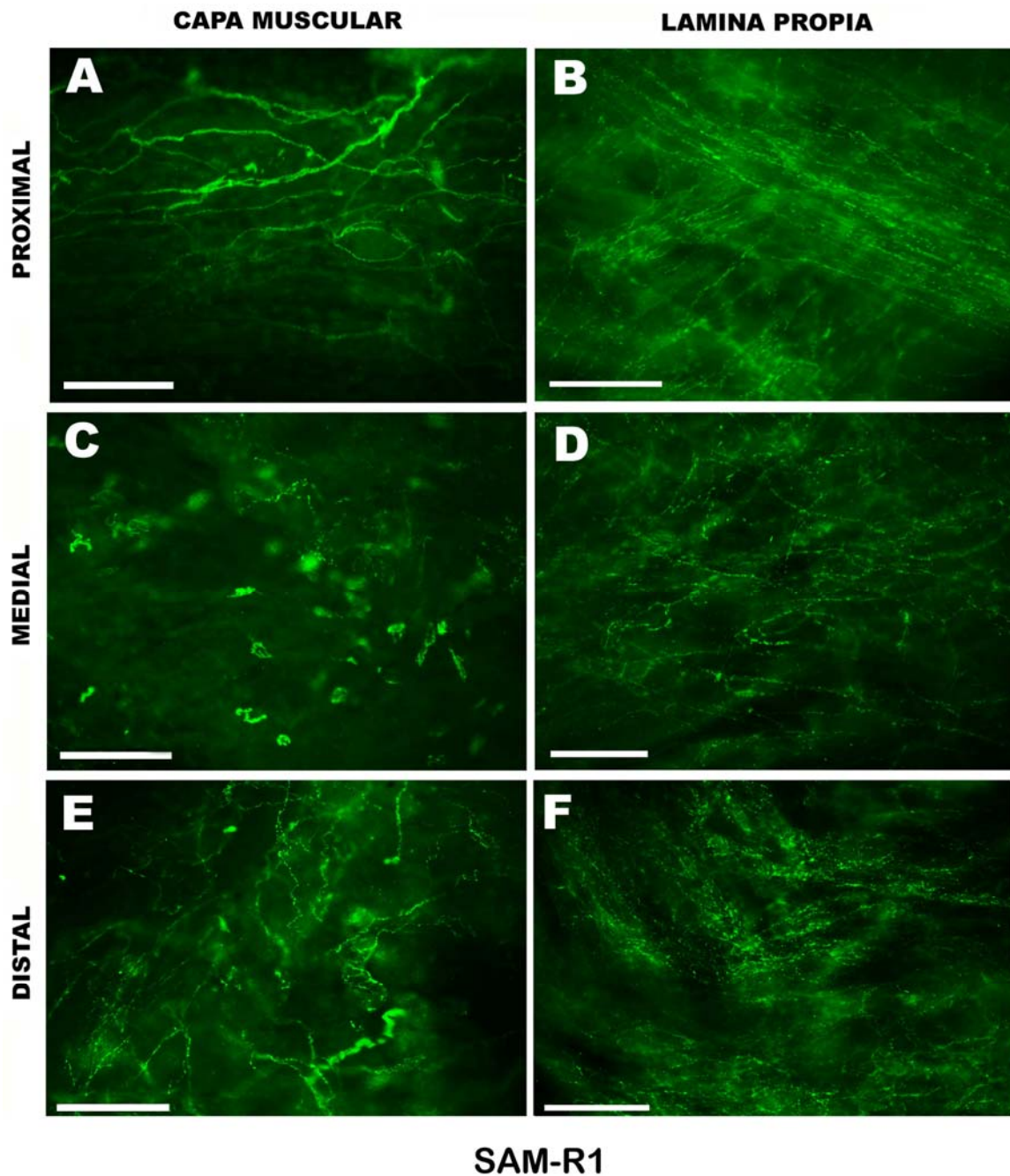


Figura 99. Inmunorreactividad a VAcHT en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-R1: proximal (**A**, **B**), medial (**C**, **D**) y distal (**E**, **F**). Se puede observar una mayor densidad de nervios colinérgicos en la zona proximal y distal respecto a la medial, de la capa muscular, mientras que en la lámina propia aparece una densa red colinérgica homogénea a lo largo de toda la uretra. Nótese en **C** la presencia de varias placas motoras que innervan el músculo estriado uretral. Barra= 100 μ m.

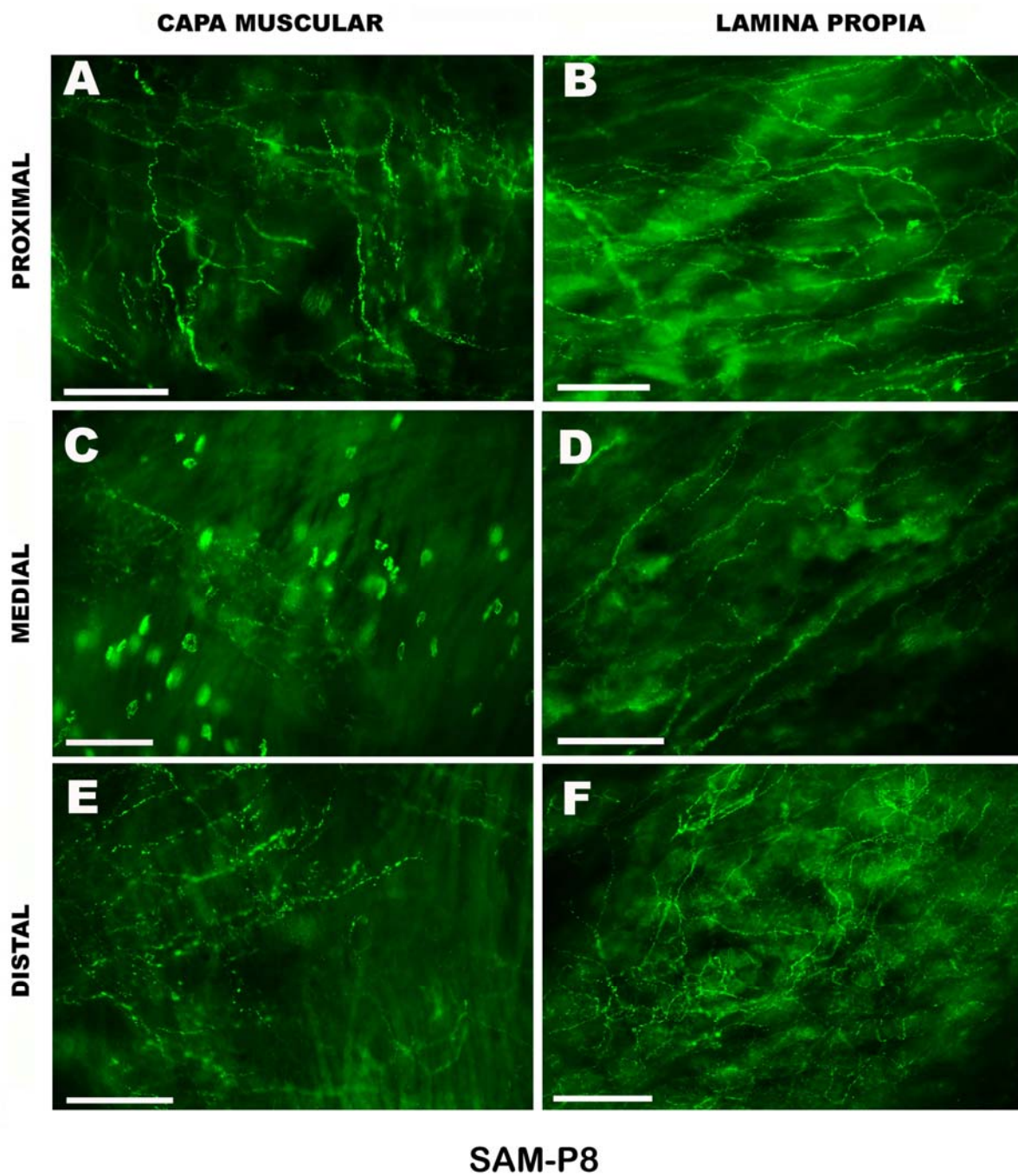


Figura 100. Inmunorreactividad a VACHT en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (**A**, **C**, **E**) y lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-P8: proximal (**A**, **B**), medial (**C**, **D**) y distal (**E**, **F**). No se observan grandes diferencias respecto a SAM-R1. En **C** aparecen numerosas placas motoras. Barra= 100 μm .

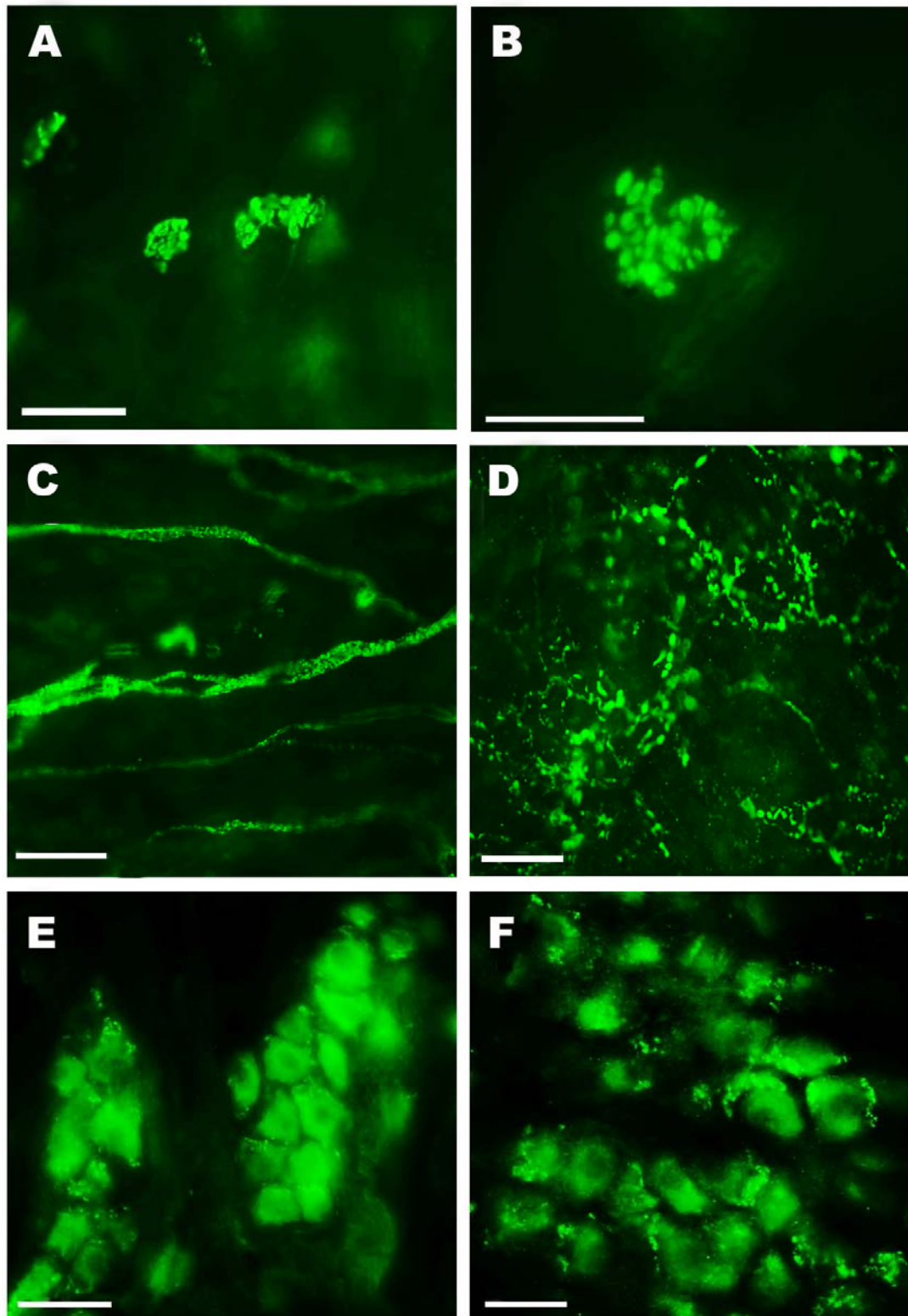


Figura 101. Detalles de estructuras inmunorreactivas a VAcHT en la capa muscular de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*. Placas motoras en zona medial de SAM-R1. *C* y *D*. Inervación colinérgica en la zona proximal de SAM-R1 mostrando inervación perivascular en *C*. *E* y *F*: Ganglios intramurales en la zona proximal de SAM-P8. Barra = 25 μ m.

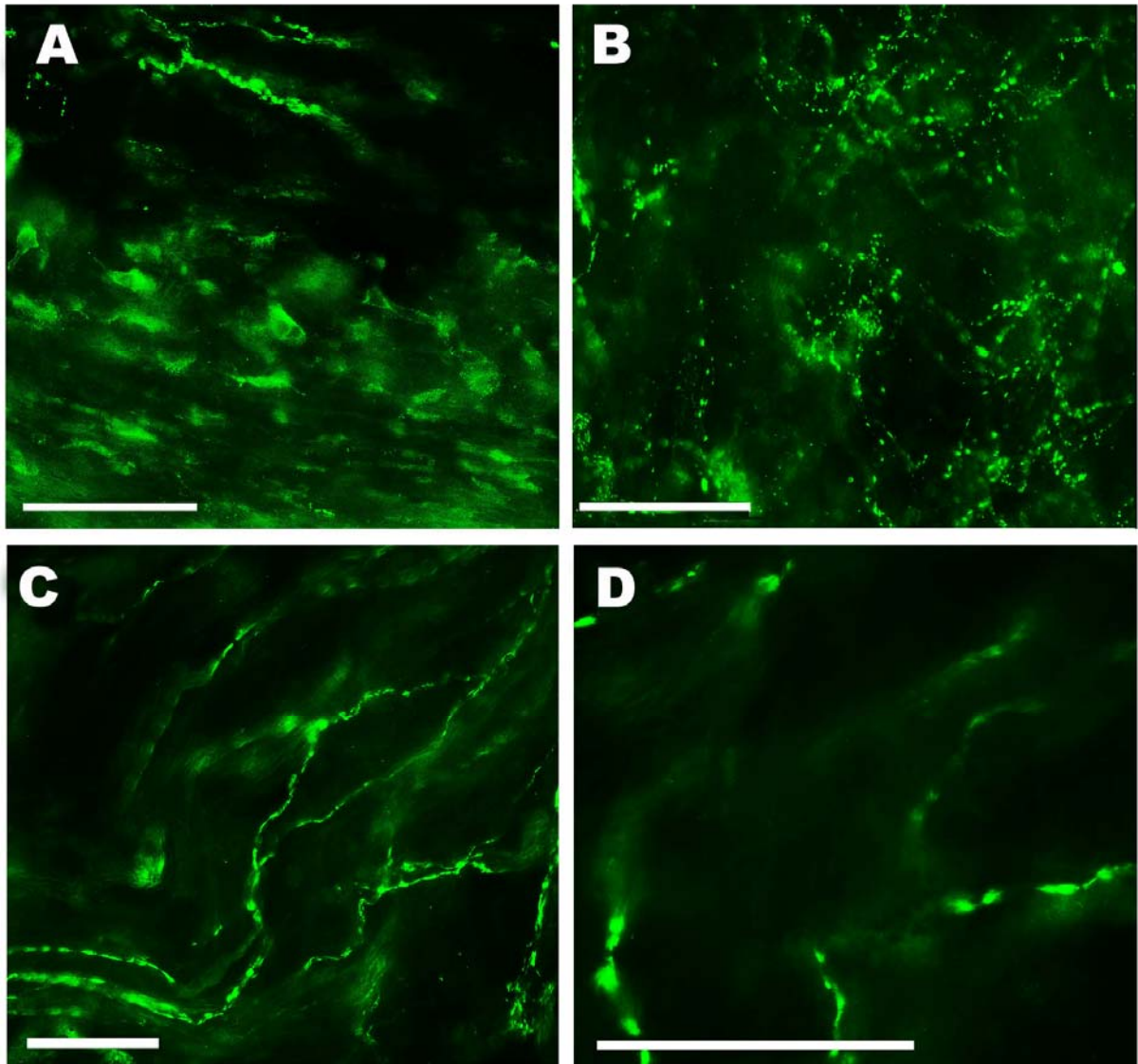


Figura 102. Detalles de estructuras inmunorreactivas a VAcHT en lámina propia de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. **A.** Posibles células intersticiales de Cajal (ICCs) en zona proximal de SAM-P8. **B:** Inervación en zona distal de SAM-P8. **C y D.** Inervación colinérgica a menores y mayores aumentos en zona medial de SAM-R1. Barra = 50 μm (A, B y C) y 25 μm (D).

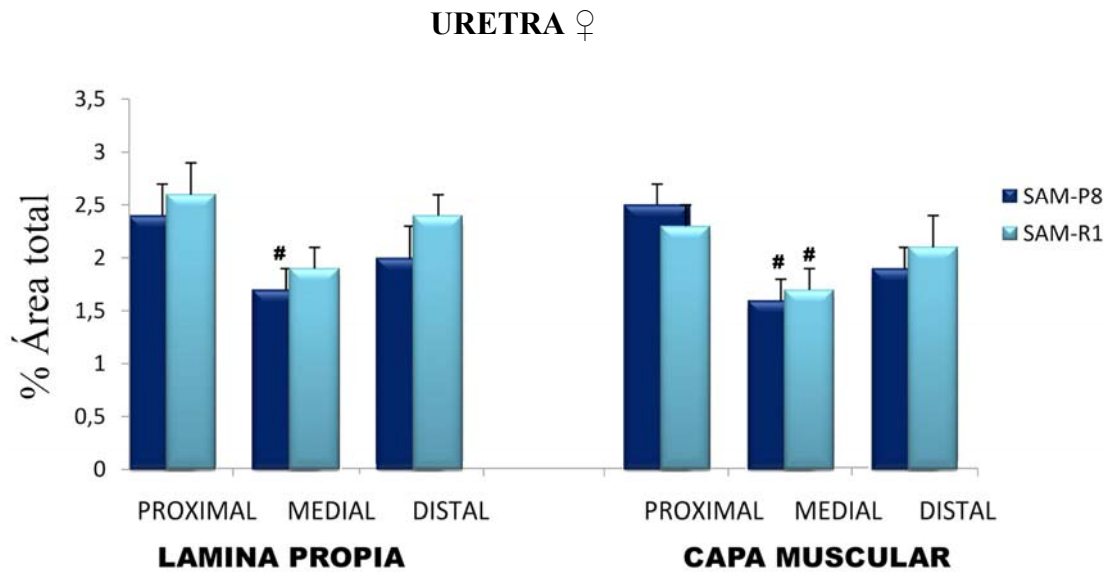


Figura 103. Cuantificación de la inmunorreactividad a VAcHt en diferentes regiones uretrales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). # $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a la zona proximal.

4.3.4.2. Inervación nitrérgica

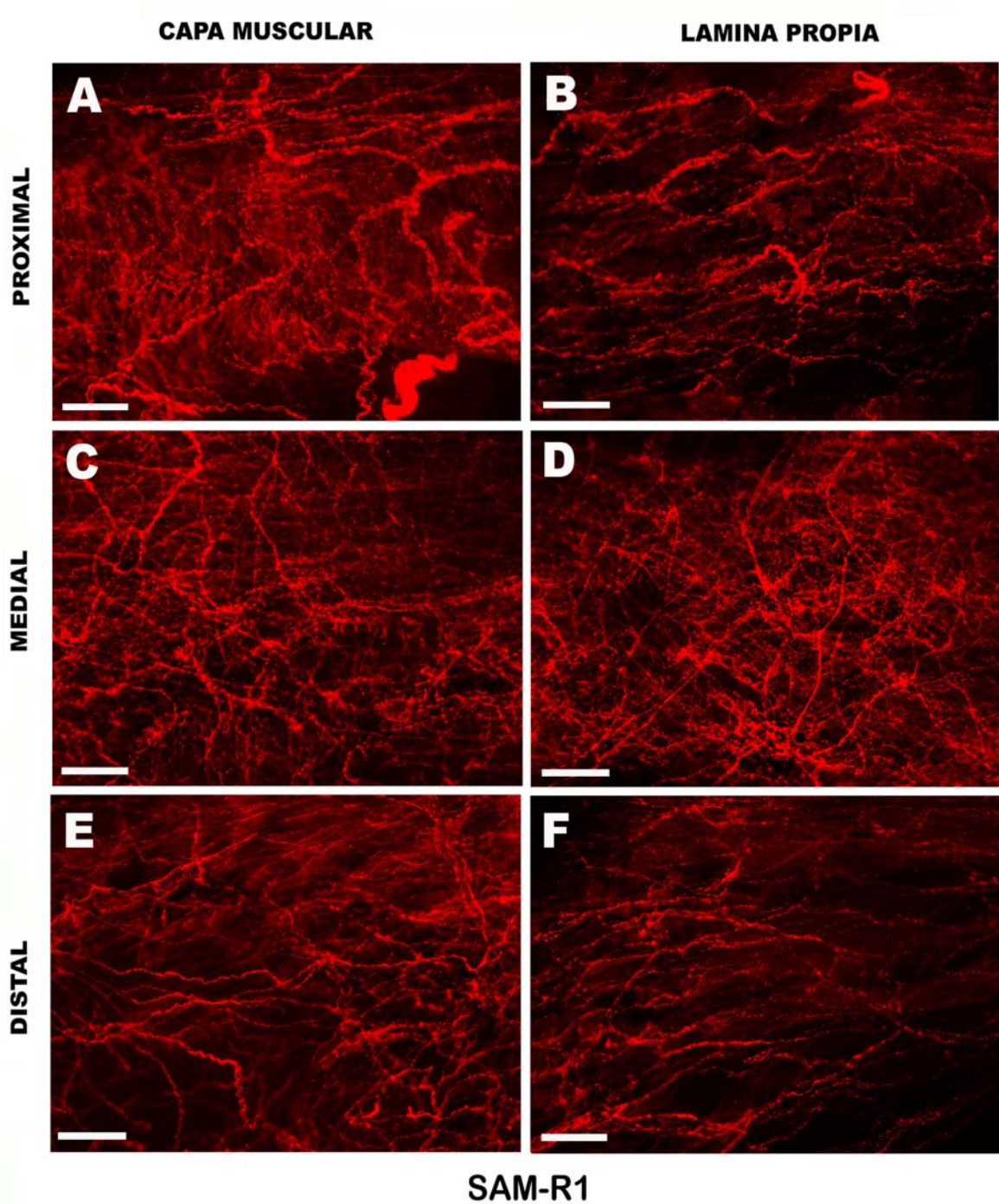


Figura 104. Inmunorreactividad a nNOS en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular (**A**, **C**, **E**) y la lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-R1: proximal (**A**, **B**), medial (**C**, **D**) y distal (**E**, **F**). Destaca la alta densidad de inervación uniforme en todas las zonas de la capa muscular y una aparente mayor densidad en la parte medial de la lámina propia. Barra = 100 μ m.

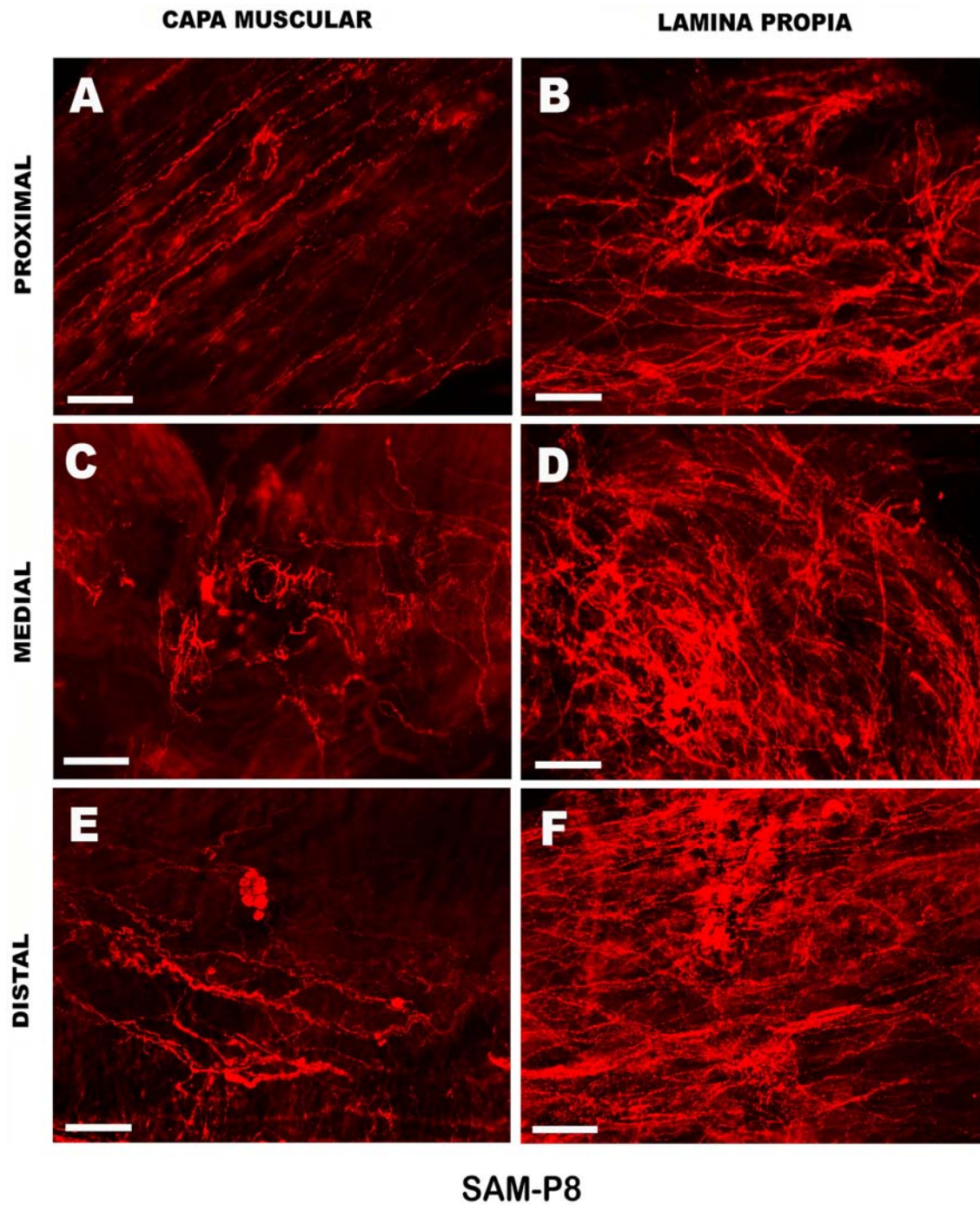


Figura 105. Inmunorreactividad a nNOS en preparaciones *whole-mount* de capa muscular (A, C, E) y lámina propia (B, D, F) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-P8: proximal (A, B), medial (C, D) y distal (E, F). Destaca un considerable aumento en la densidad de nervios nitrérgicos en la lámina propia, mientras que éstos disminuyen en la capa muscular en comparación con los animales SAM-R1. Nótese la presencia de un ganglio intramural en E. Barra = 100 μ m.

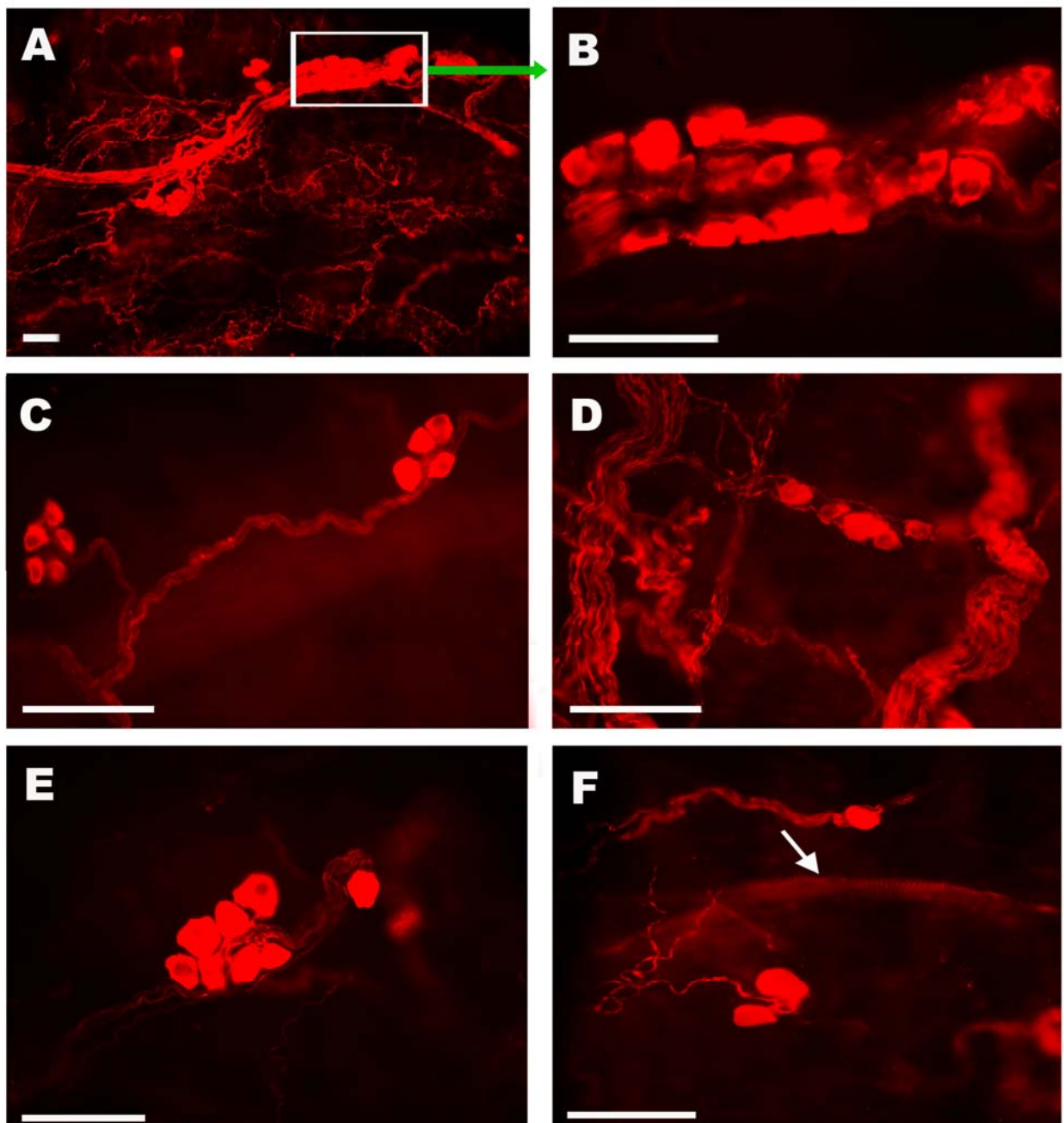


Figura 106. Detalles de estructuras inmunorreactivas a nNOS en la capa muscular de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*. Terminaciones nerviosas, troncos, y ganglios intramurales en la zona proximal de SAM-P8 a menores y mayores aumentos respectivamente. *C* y *D*: Troncos nerviosos y ganglios intramurales en la zona proximal de SAM-R1. *E* y *F*. Troncos nerviosos y ganglios intramurales en la zona medial de SAM-P8, la flecha en *F* señala una fibra estriada. Barra= 50 μ m.

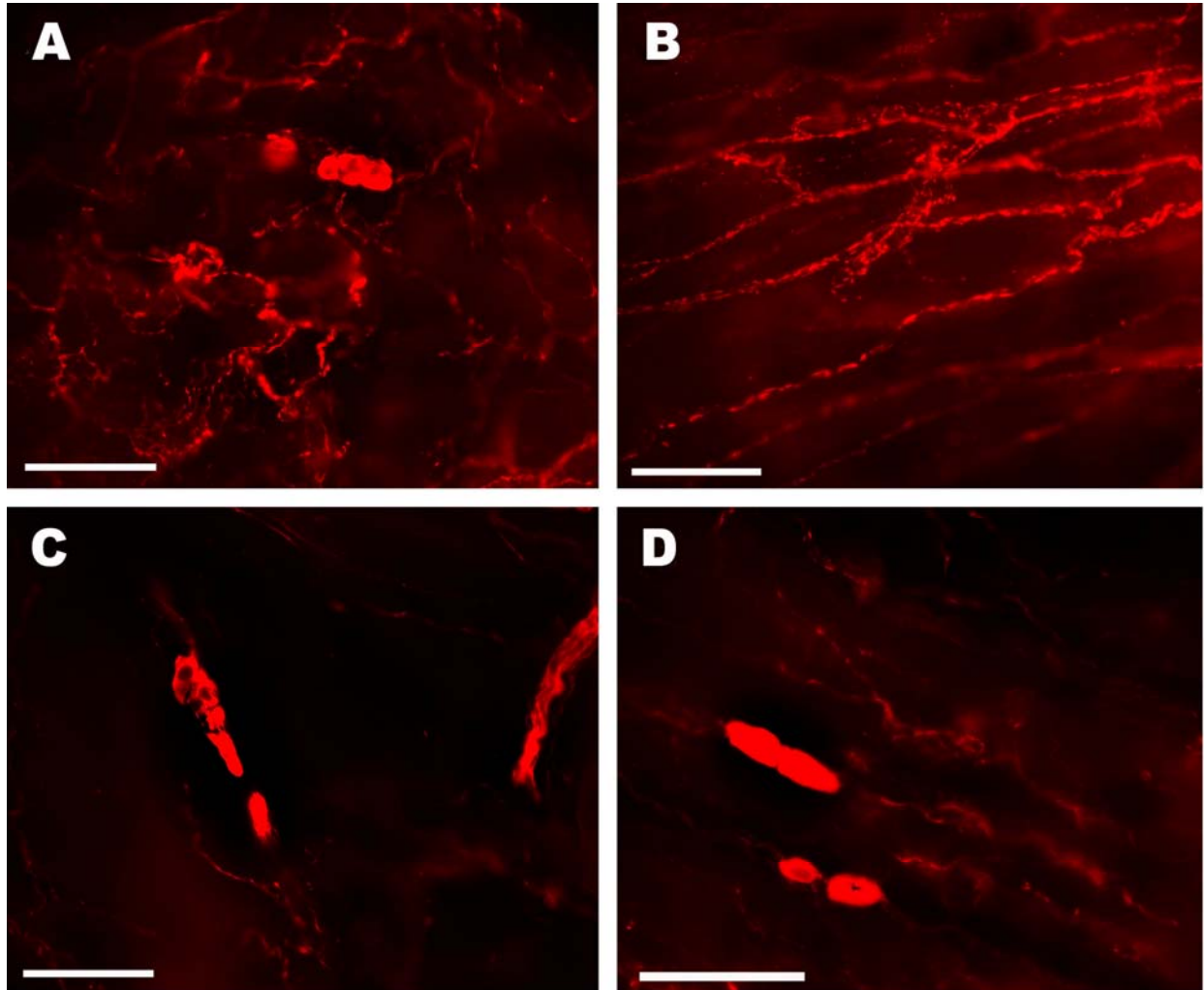


Figura 107. Detalles de estructuras inmunorreactivas a nNOS en la lámina propia de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*. Terminaciones nerviosas y ganglios intramurales en la zona proximal de SAM-P8. *C* y *D*: Terminaciones nerviosas, troncos y ganglios intramurales en la zona proximal de SAM-R1. Barra= 50 μ m.

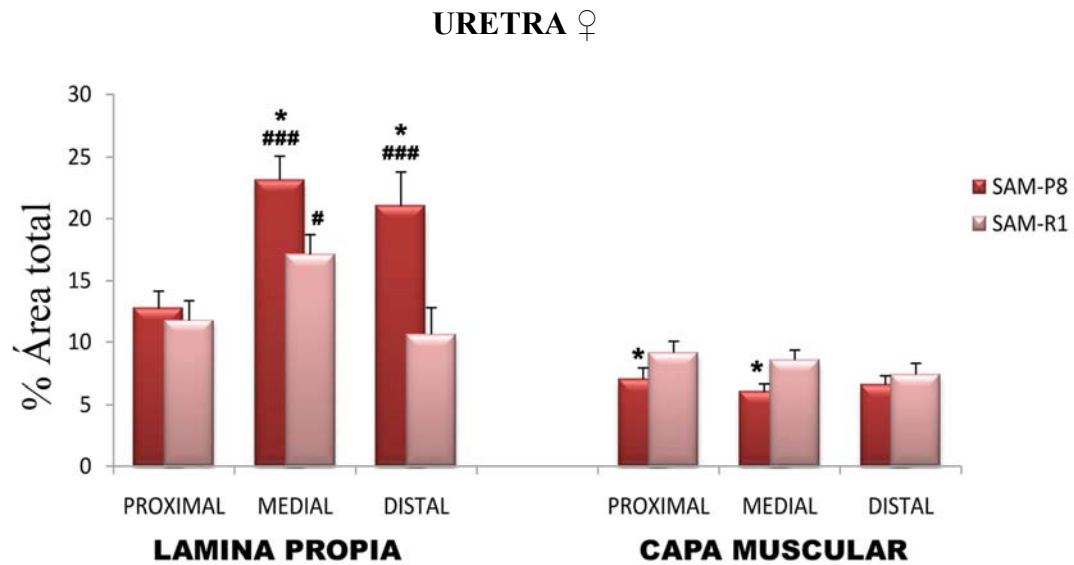


Figura 108. Cuantificación de la inmunorreactividad a nNOS en diferentes regiones uretrales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a $10\times$ de al menos 4 animales diferentes). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y # $p<0,05$ y ### $p<0,001$ respecto a la zona proximal.

4.3.4.3. Inervación adrenérgica

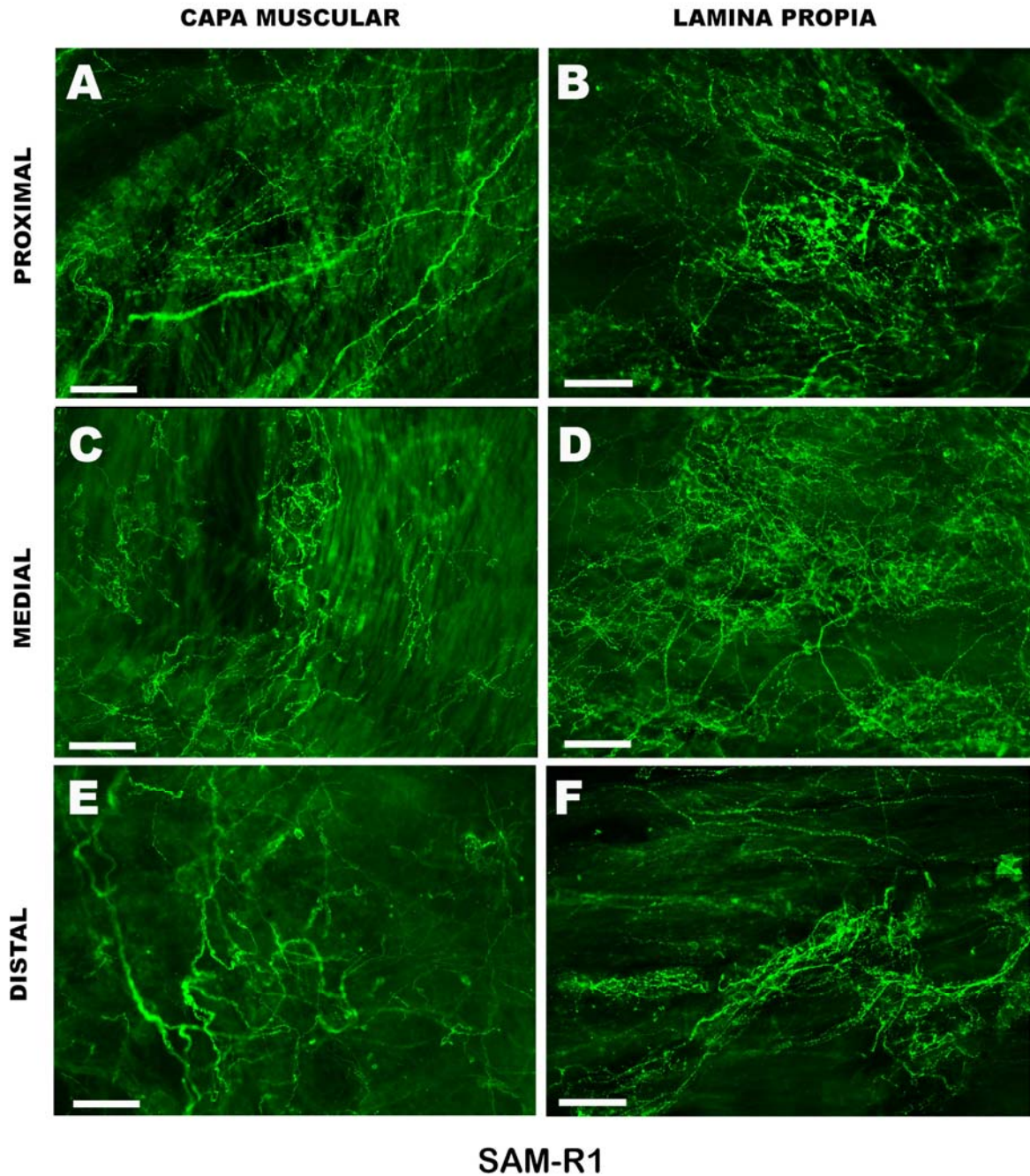


Figura 109. Inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular (**A**, **C**, **E**) y la lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-R1: proximal (**A**, **B**), medial (**C**, **D**) y distal (**E**, **F**). Se observa una intensa inervación adrenérgica en ambas capas y en todas las regiones uretrales. Barra = 100 μ m.

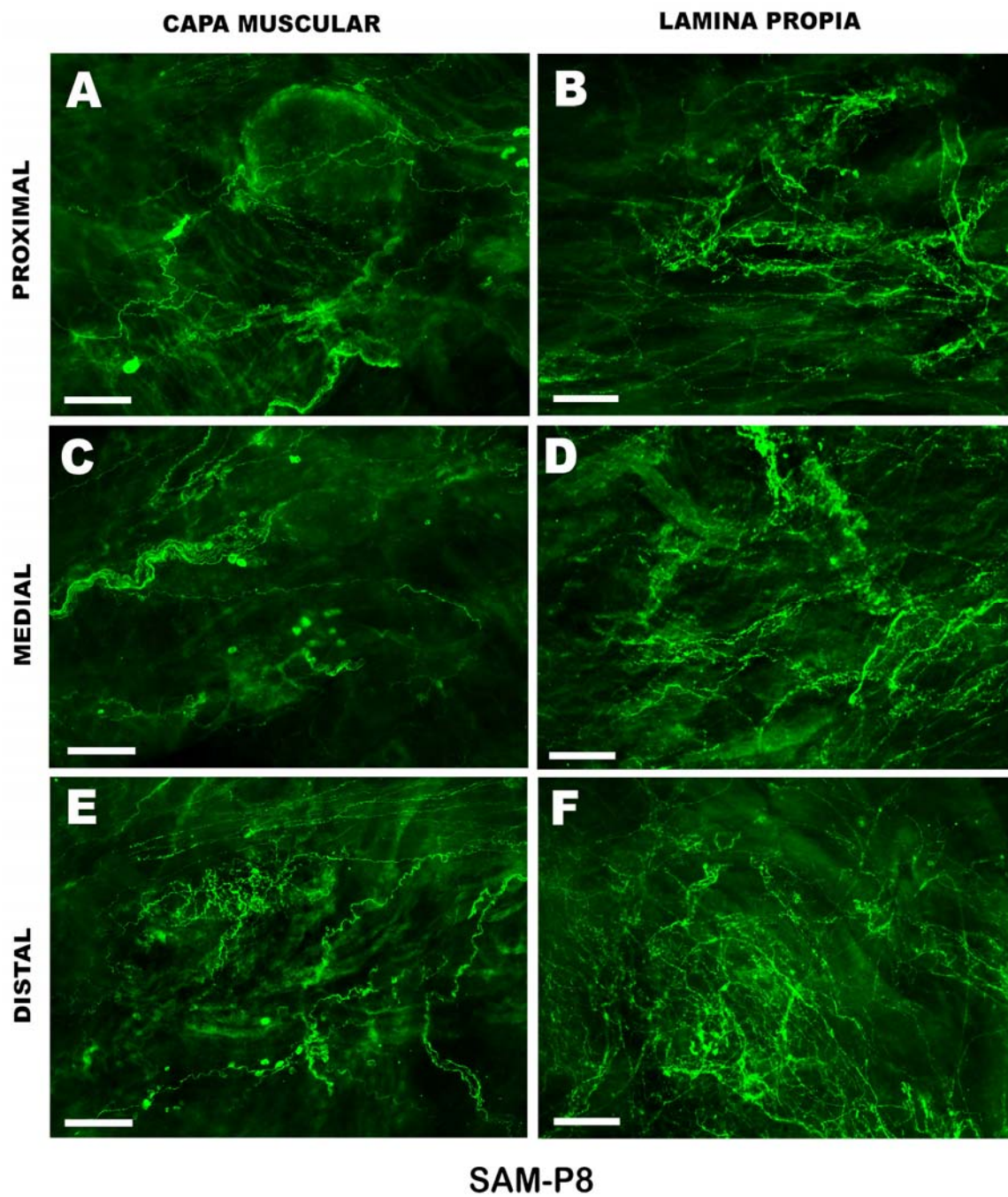


Figura 110. Inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular (**A**, **C**, **E**) y la lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-P8: proximal (**A**, **B**), medial (**C**, **D**) y distal (**E**, **F**). La distribución es similar a la descrita en SAM-R1. Barra = 100 μ m.

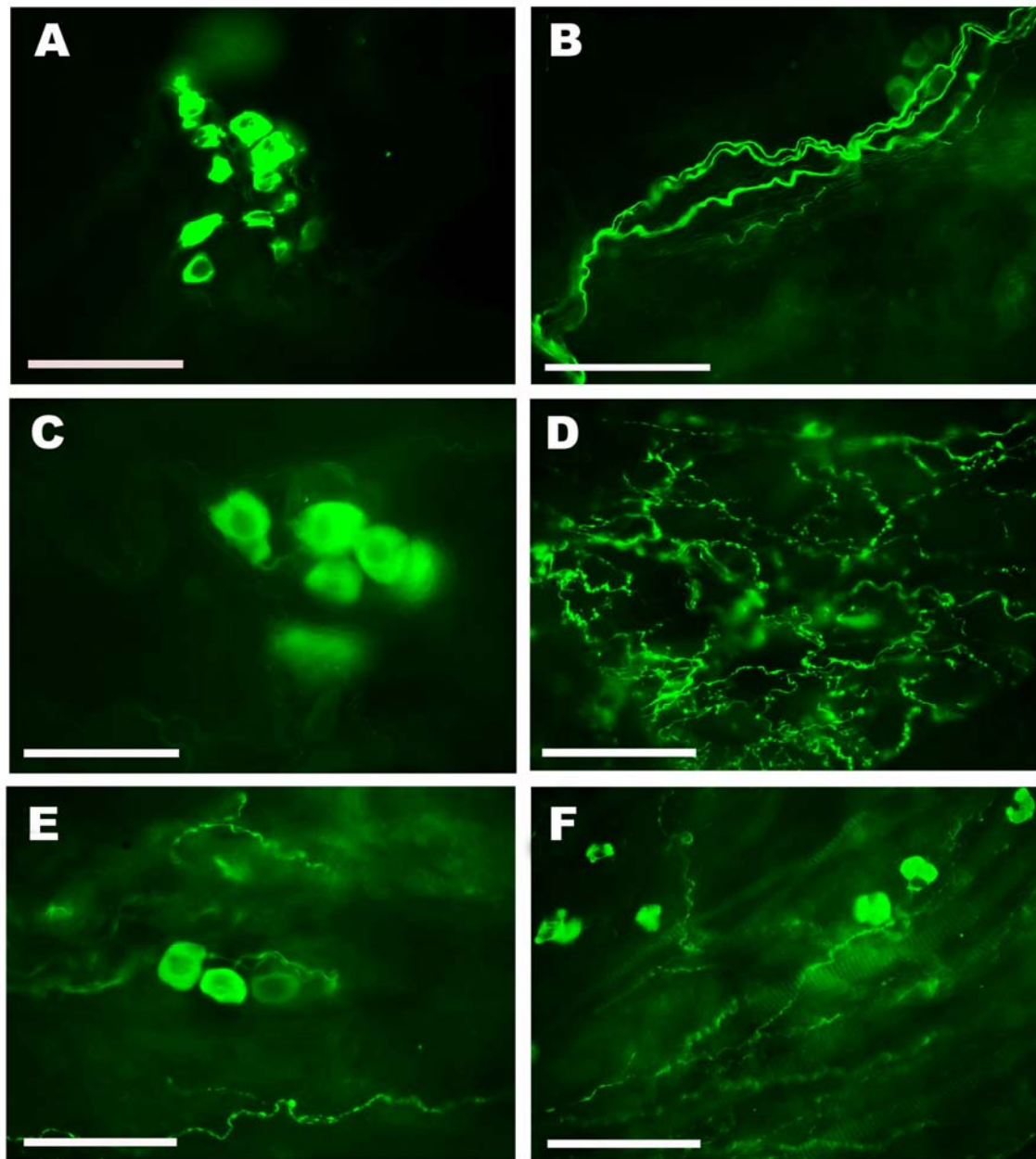


Figura 111. Detalles de estructuras inmunorreactivas a TSH en la capa muscular de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. Terminaciones nerviosas y ganglios intramurales en la zona proximal de SAM-R1 (**A**, **B** y **C**); zona proximal de SAM-P8 (**D** y **E**) y zona distal de SAM-P8 (**F**). Barra = 50 μ m.

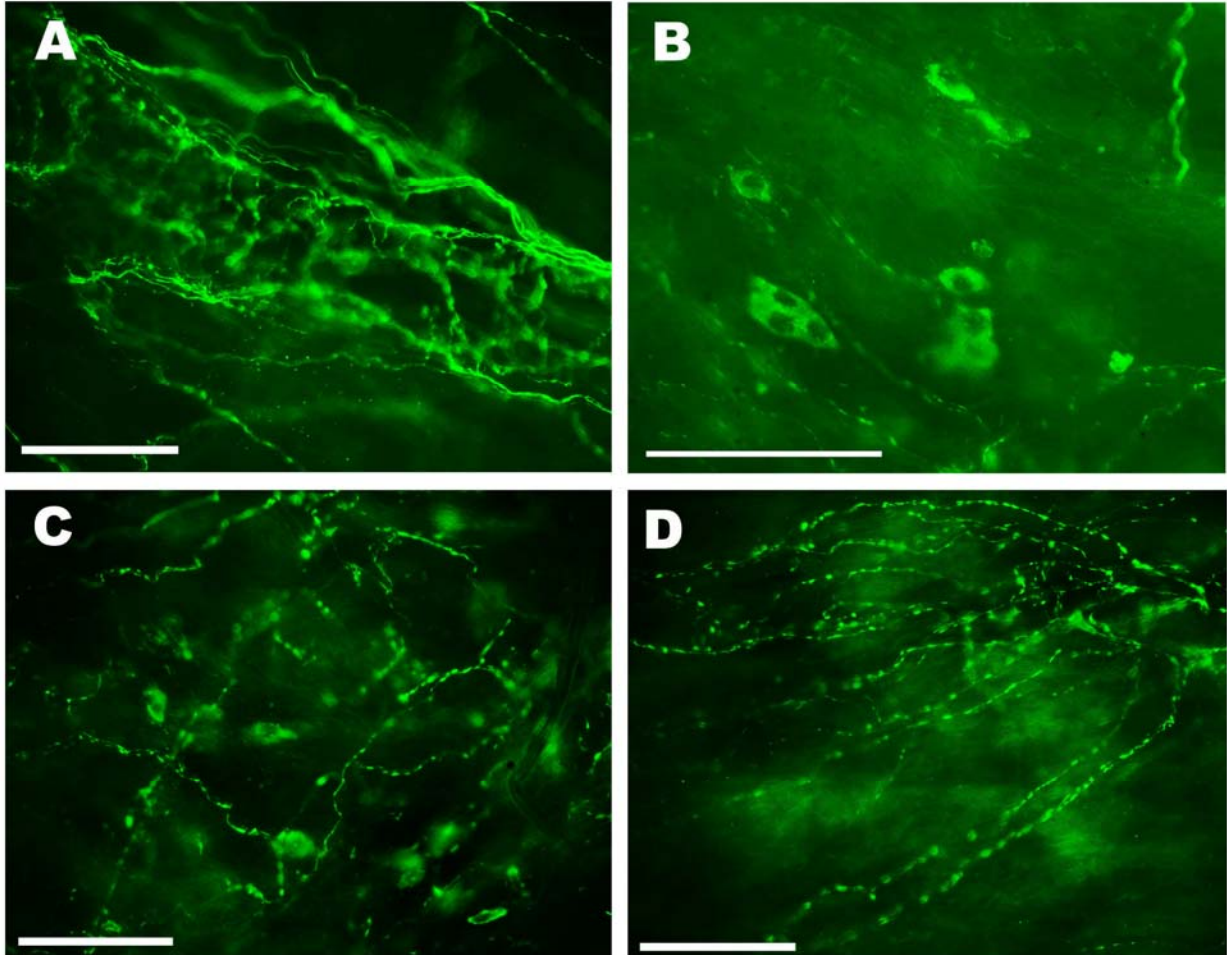


Figura 112. Detalles de estructuras inmunorreactivas a TSH en la lámina propia de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. **A.** Inervación perivascular en la zona proximal de SAM-R1. **B, C** y **D:** Terminaciones nerviosas y ganglios intramurales en zona proximal de SAM-P8. Barra= 50 μ m.

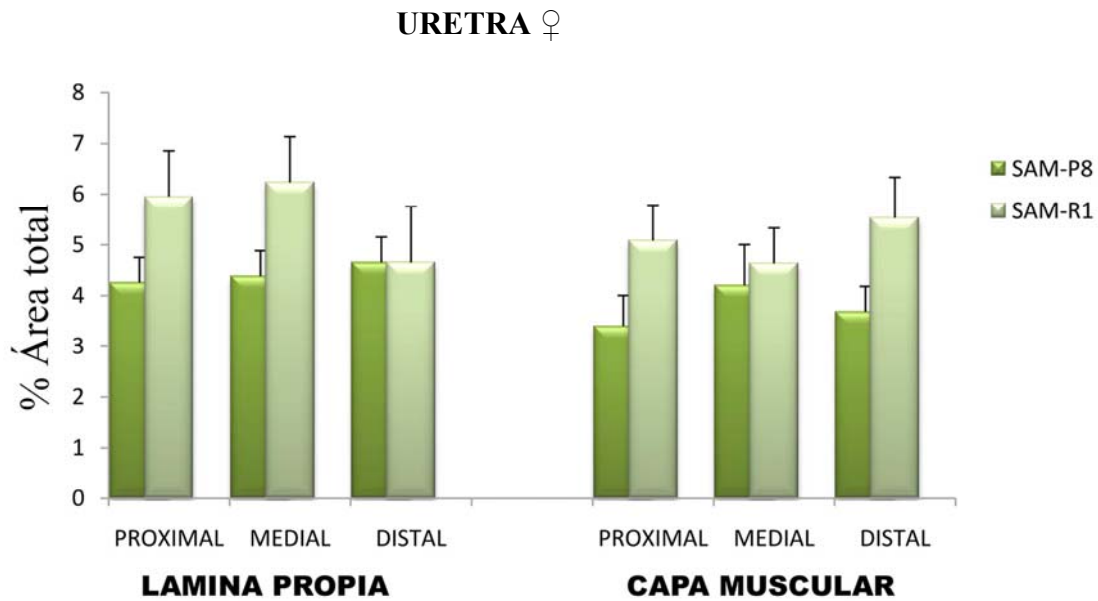


Figura 113. Cuantificación de la inmunorreactividad a TSH en diferentes regiones uretrales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a $10\times$ de al menos 4 animales diferentes). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas zonas uretrales, ni entre animales SAM-R1 y SAM-P8 (ANOVA).

4.3.5. Cambios en la densidad de ICCs uretrales

4.3.5.1 Densidad de ICCs positivas a vimentina

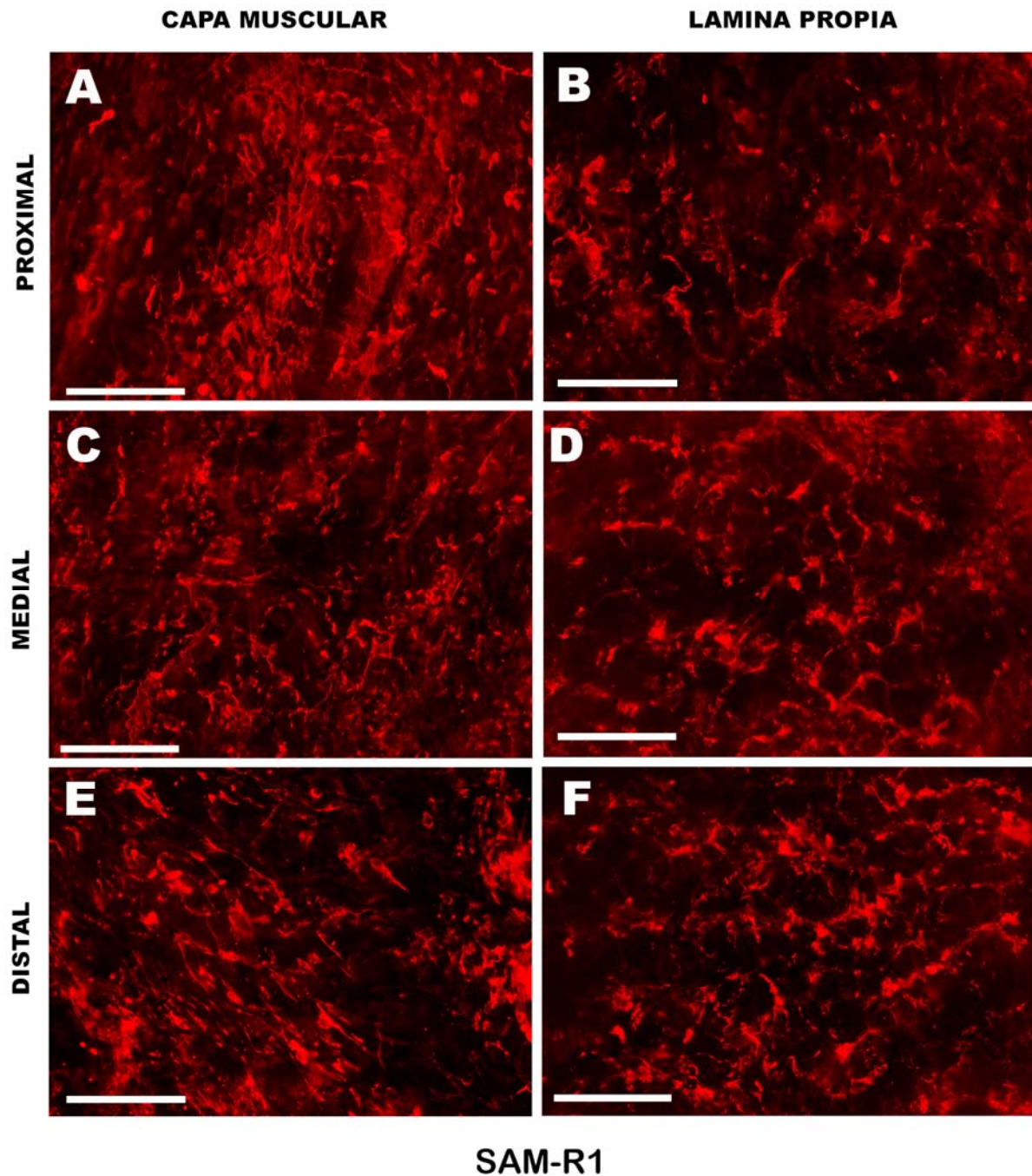


Figura 114. Inmunorreactividad a vimentina en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular (A, C, E) y la lámina propia (B, D, F) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-R1: proximal (A, B), medial (C, D) y distal (E, F). Se puede apreciar la presencia de una densa red de ICCs en ambas capas de todas las regiones de la uretra. Barra = 100 μ m.

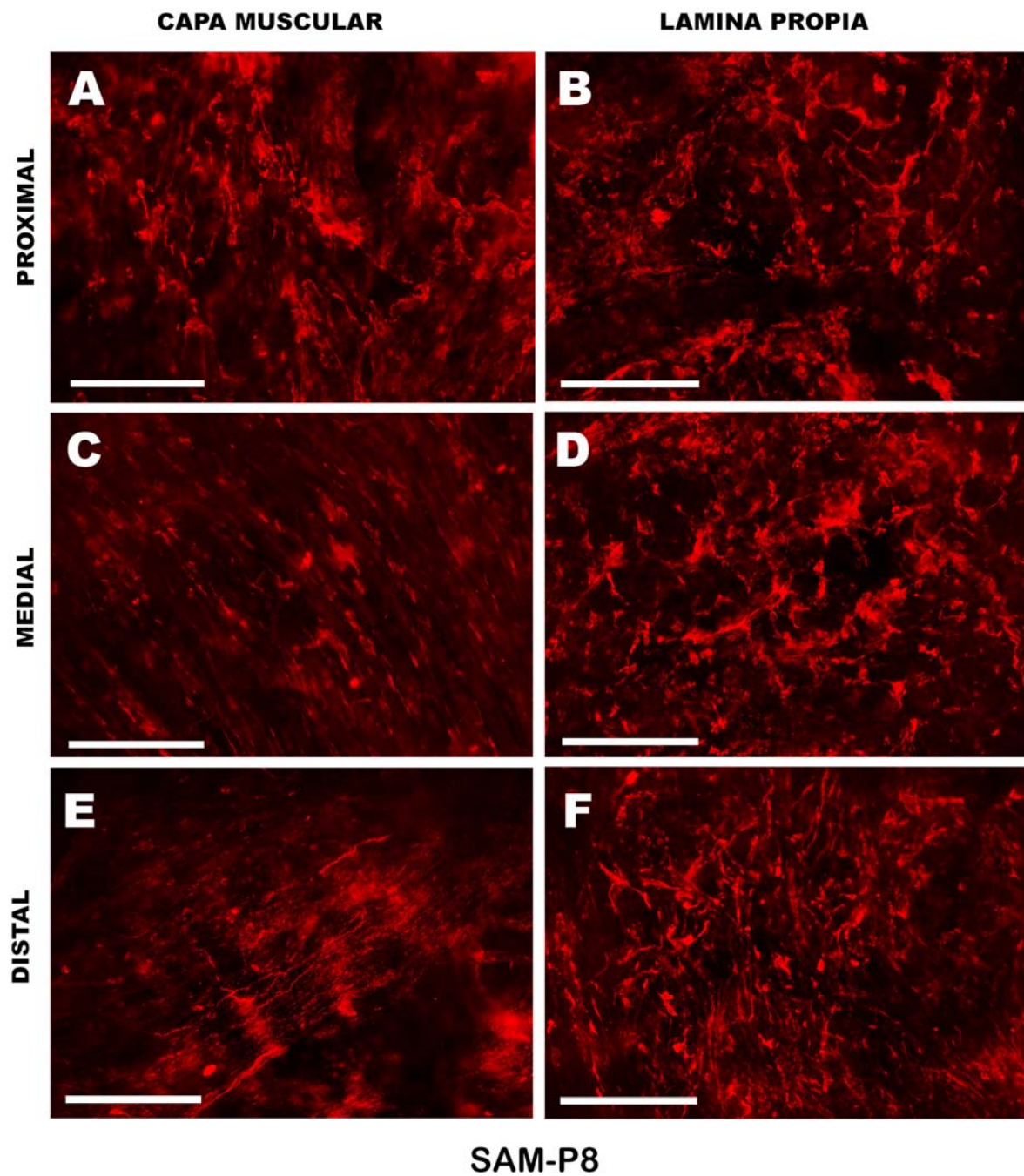


Figura 115. Inmunorreactividad a vimentina en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular (**A**, **C**, **E**) y la lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-P8: proximal (**A**, **B**), medial (**C**, **D**) y distal (**E**, **F**). Se puede apreciar una disminución en la densidad de ICCs a lo largo de toda la capa muscular con respecto a SAM-R1, mientras que en la lámina propia no se observan diferencias. Barra = 100 μ m.

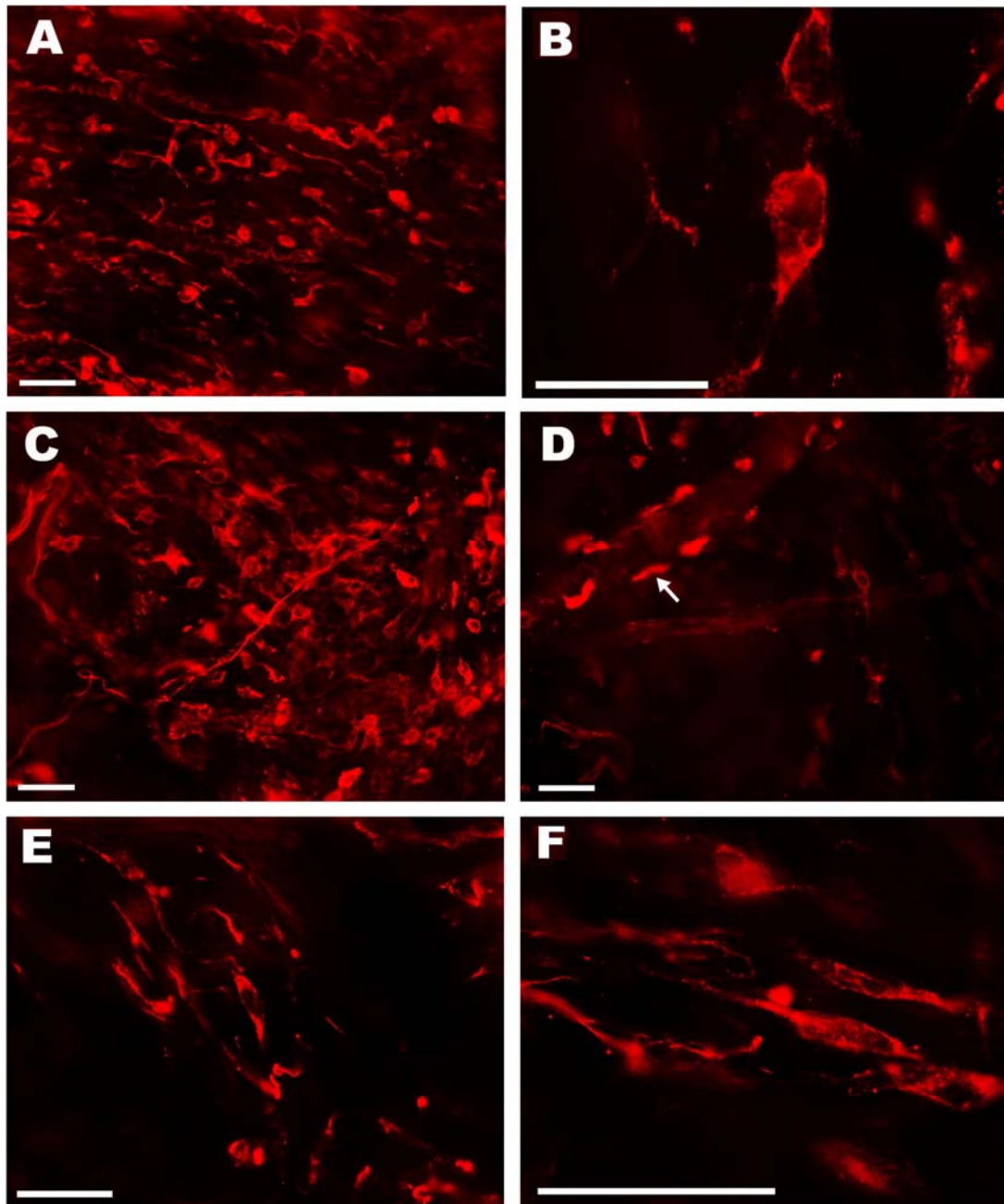


Figura 116. Detalle de las ICCs inmunorreactivas a vimentina en la capa muscular de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*. ICCs en zona proximal de SAM-P8. *C*, *E* y *F*. ICCs en zona proximal de SAM-R1. *D*: ICCs rodeando una fibra estriada en zona distal de SAM-R1. Se puede observar el típico aspecto de las ICCs uretrales de cuerpo fusiforme con un gran núcleo central y escaso citoplasma del que parten dos o más prolongaciones. Barra = 25 μ m.

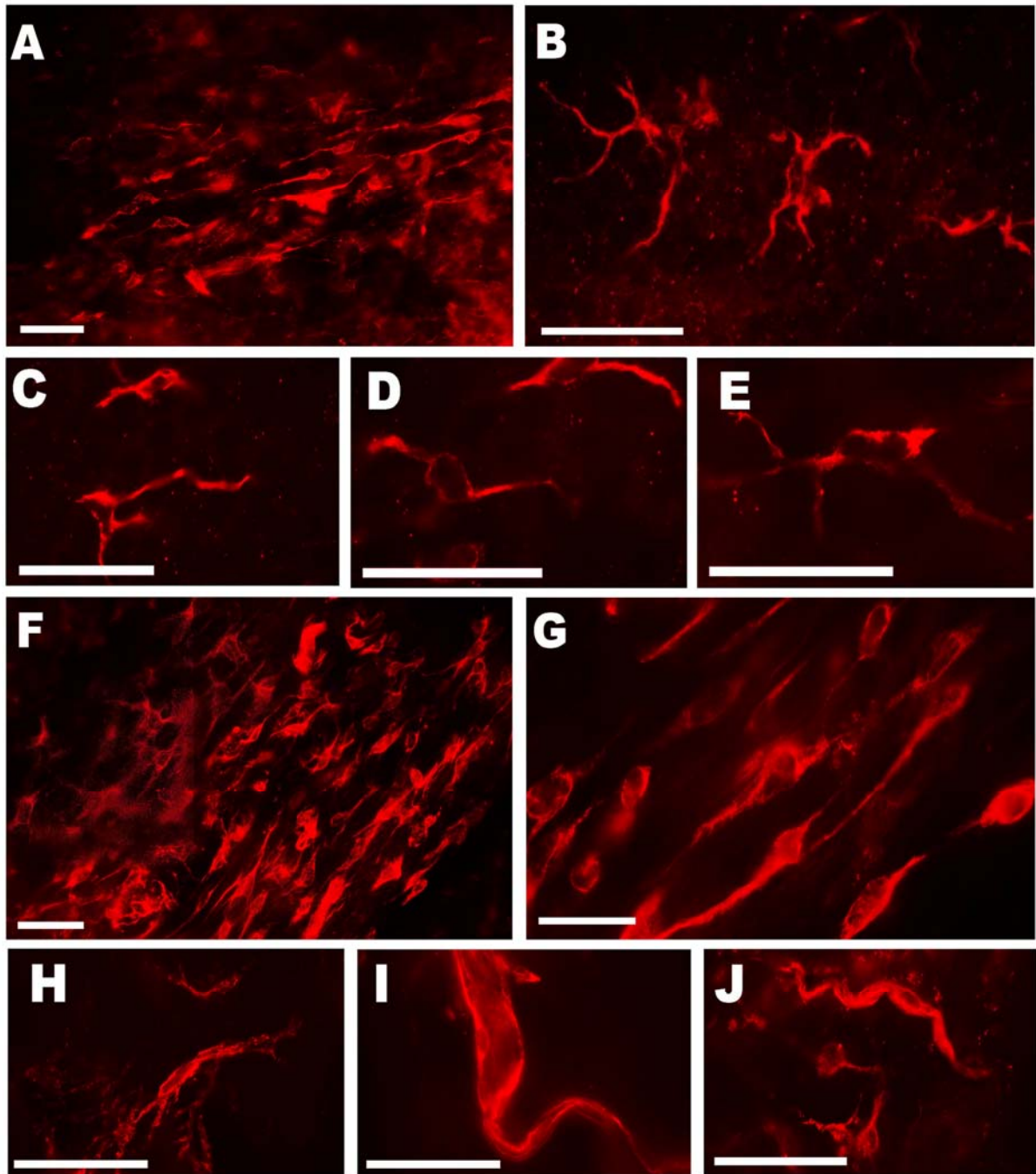


Figura 117. Detalle de las ICCs inmunorreactivas a vimentina en la lámina propia de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. *A-E*. ICCs en zona proximal de SAM-P8. *F-J*. ICCs en zona proximal de SAM-R1. Nótese los dos tipos de morfología en que pueden aparecer las ICCs: fusiforme (*D* y *G*) y estrellada (*B*, *C*, *E*, *H*). La barra inferior izquierda representa 25 μ m.

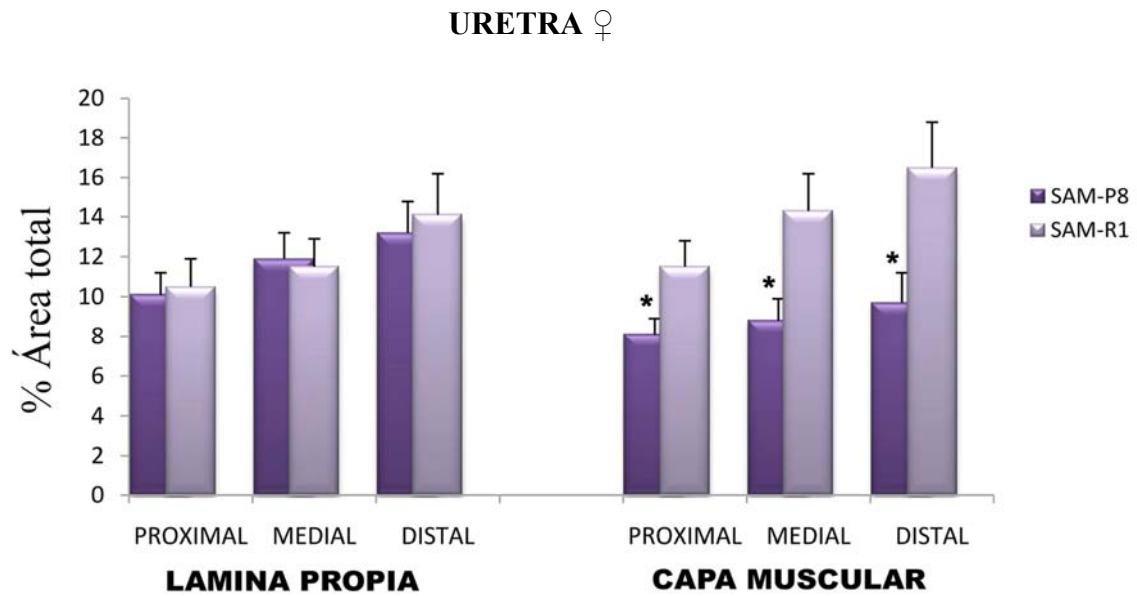


Figura 118. Cuantificación de la inmunorreactividad a vimentina en diferentes regiones uretrales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a 20X de al menos 4 animales diferentes). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

4.3.6. Resumen de las principales modificaciones inducidas por el envejecimiento en la densidad de inervación adrenérgica, colinérgica y nitrérgica y de ICCs en la uretra de ratones hembra SAM-P8 en comparación con SAM-R1

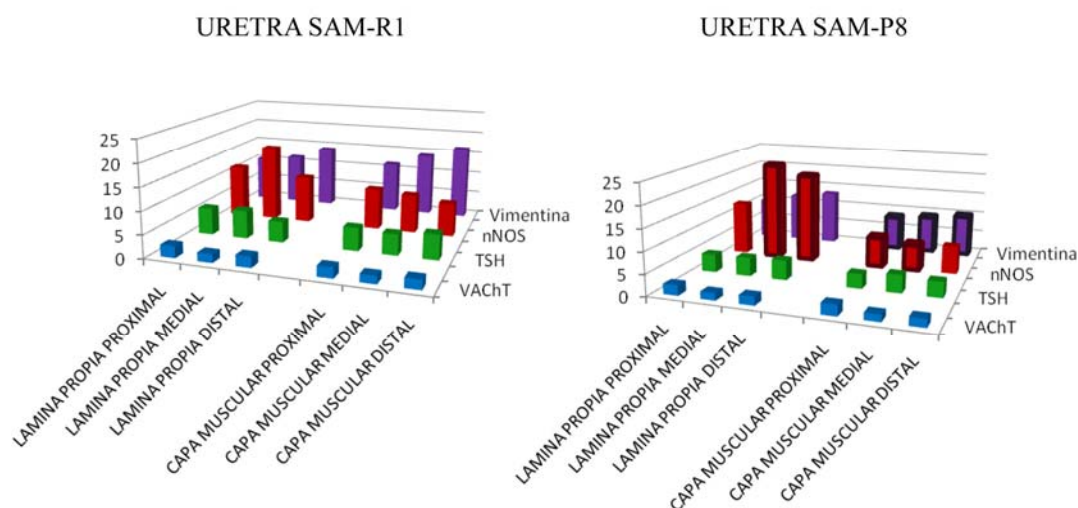


Figura 119. Gráficos resumen de la cuantificación de la inmunorreactividad a VACHT, TSH, nNOS y vimentina en diferentes regiones uretrales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como la media. Las barras marcadas con un borde más grueso señalan valores significativamente diferentes entre los animales control y los envejecidos.

4.3.7. Cambios en la inmunorreactividad a cGMP

4.3.7.1. cGMP inducido por la adición exógena de DEA/NO

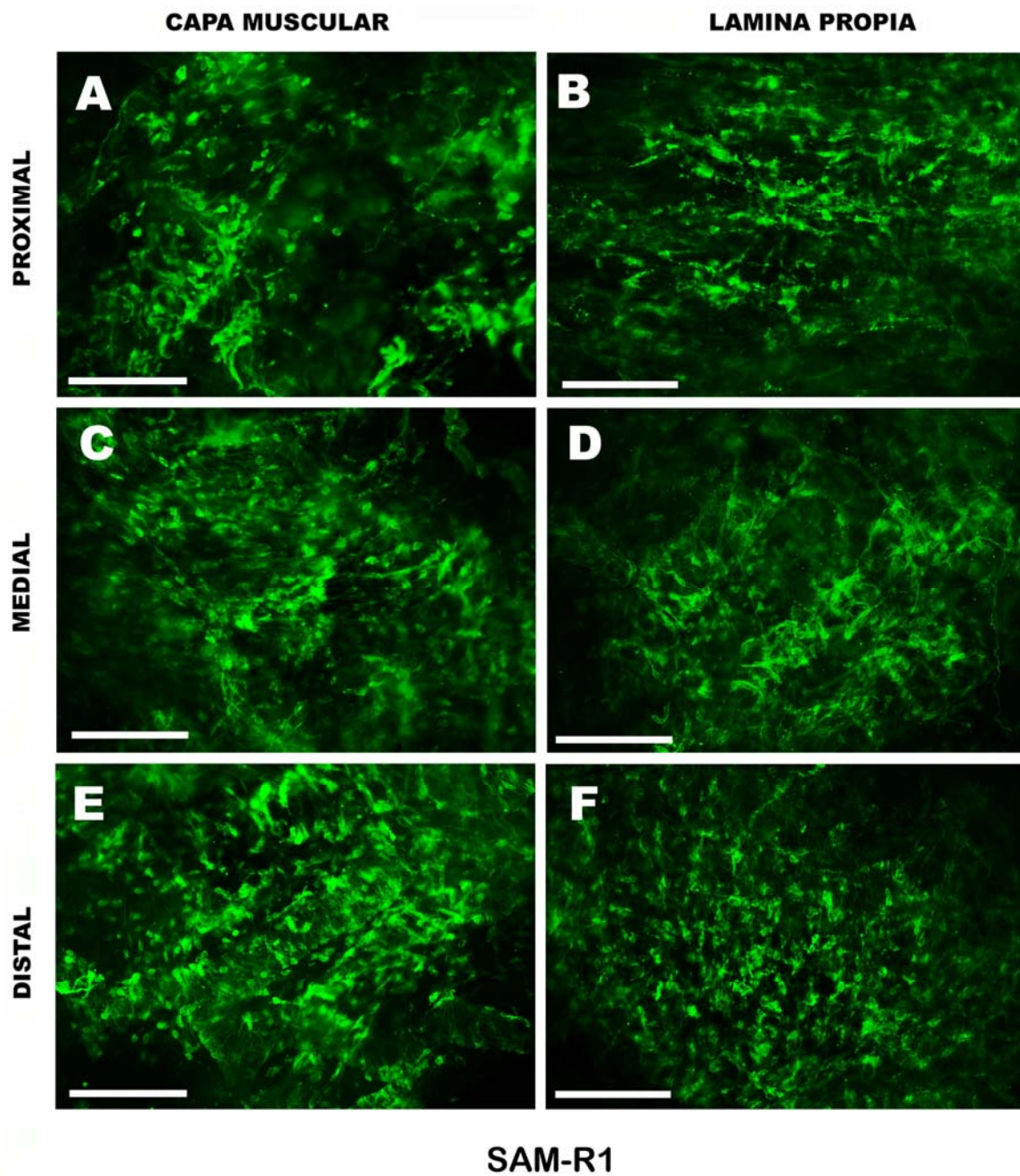


Figura 120. Inmunorreactividad a cGMP en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular (A, C, E) y la lámina propia (B, D, F) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-R1: proximal (A, B), medial (C, D) y distal (E, F) sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM) en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM). Se puede apreciar una densa red de ICCs inmunorreactivas a cGMP en ambas capas y en todas las regiones de la uretra. Barra = 100 μ m.

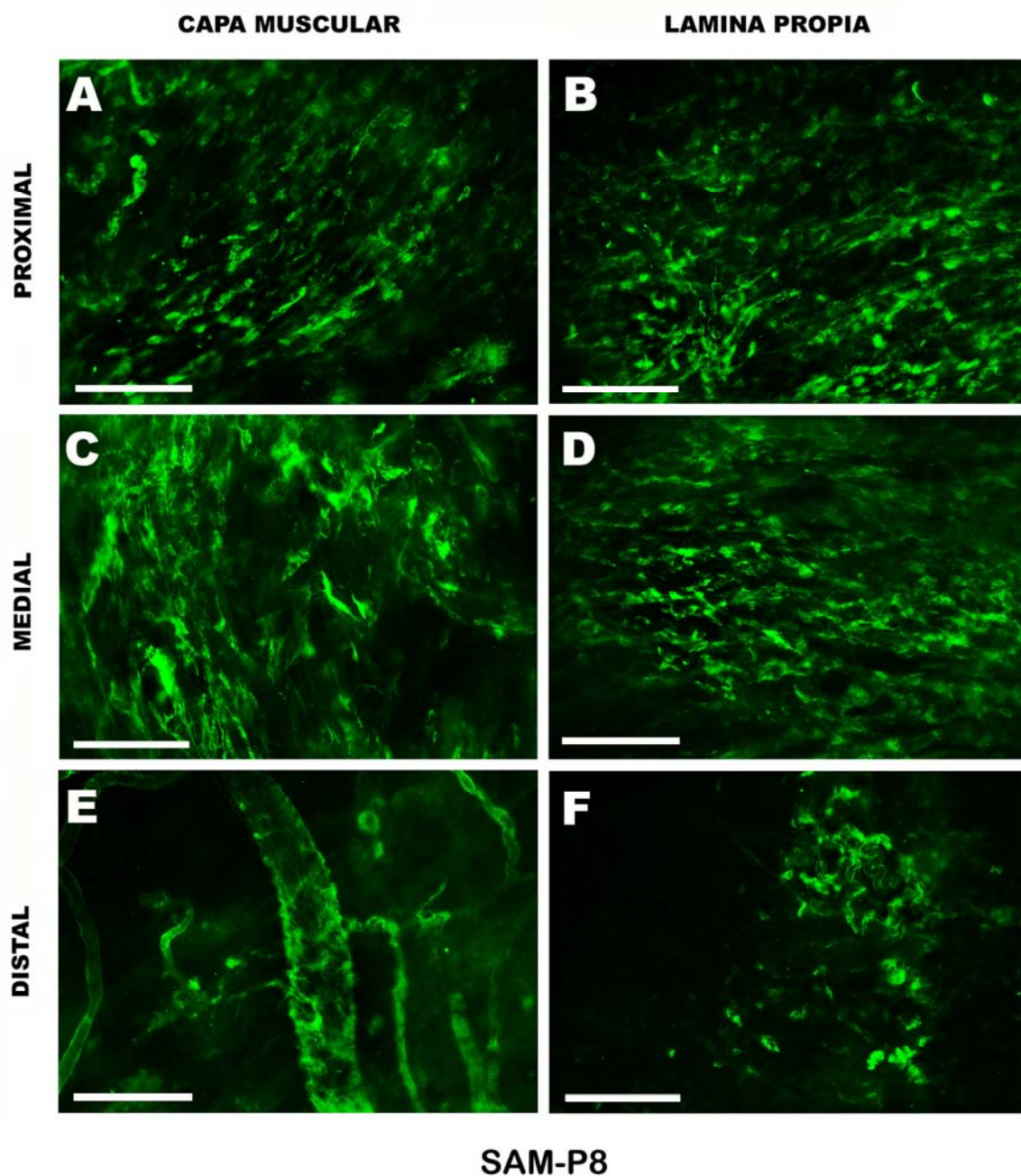


Figura 121. Inmunorreactividad a cGMP en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular (**A**, **C**, **E**) y la lámina propia (**B**, **D**, **F**) de diferentes regiones de la uretra hembra SAM-P8: proximal (**A**, **B**), medial (**C**, **D**) y distal (**E**, **F**) sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM) en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM). Obsérvese una disminución de inmunorreactividad a cGMP en la región distal tanto de lámina propia como de capa muscular respecto a SAM-R1. Barra = 100 μ m.

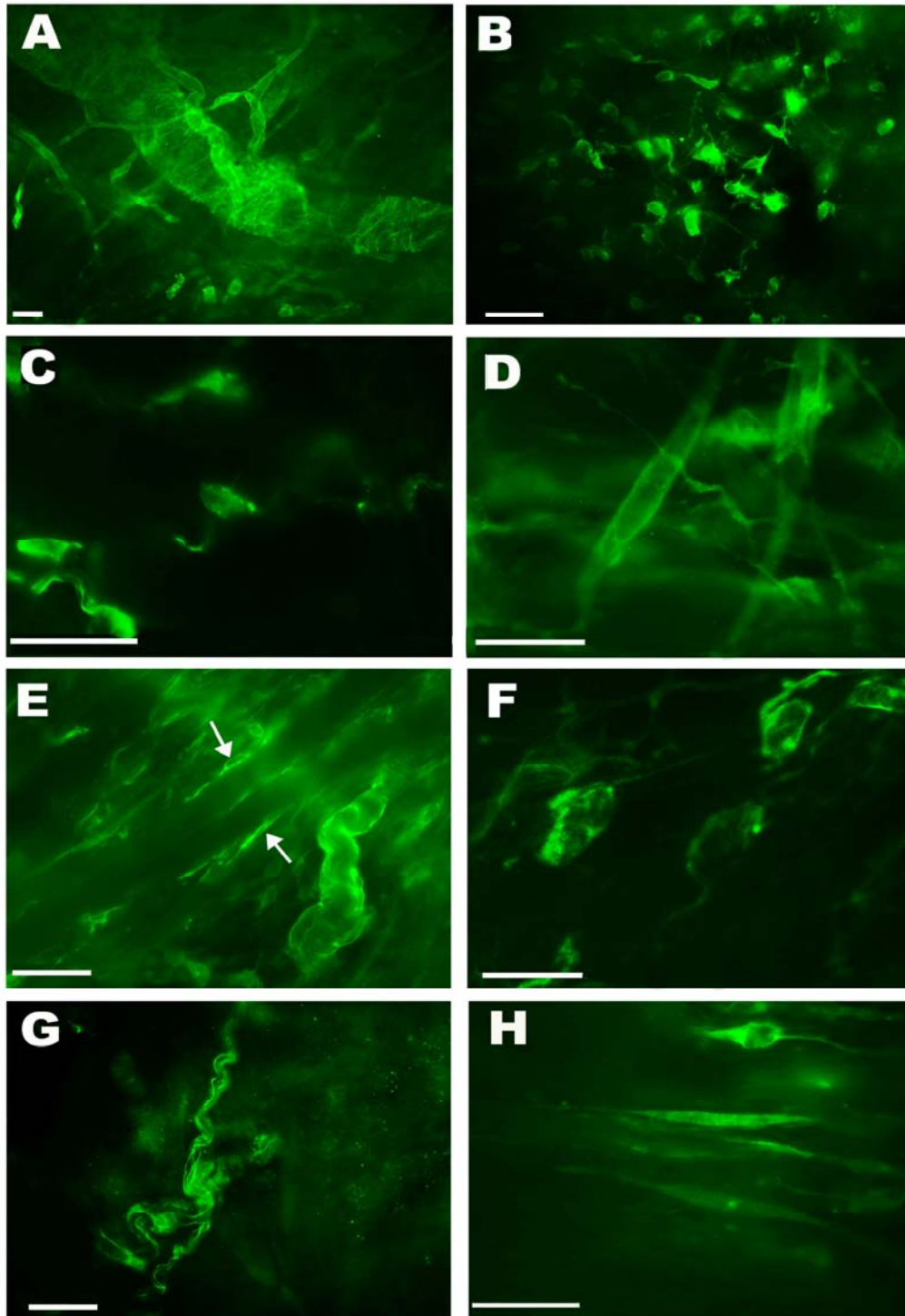


Figura 122. Detalle de estructuras inmunorreactivas a cGMP en la capa muscular de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. **A.** Estructuras perivasculares (posibles pericitos) y fibras estriadas en zona distal de SAM-P8. **B-D.** ICCs en zona proximal de SAM-P8. **E.** ICCs en zona medial de SAM-P8. **F y H.** ICCs en zona proximal de SAM-R1. **G.** Troncos nerviosos en zona medial de SAM-R1. Nótese las dos formas en que se pueden presentar las ICCs: estrellada (**B**) y fusiforme (**C, D, E, F y H**). Barra= 25 μm (**A, B, E, G y H**) y 13 μm (**C, D y F**).

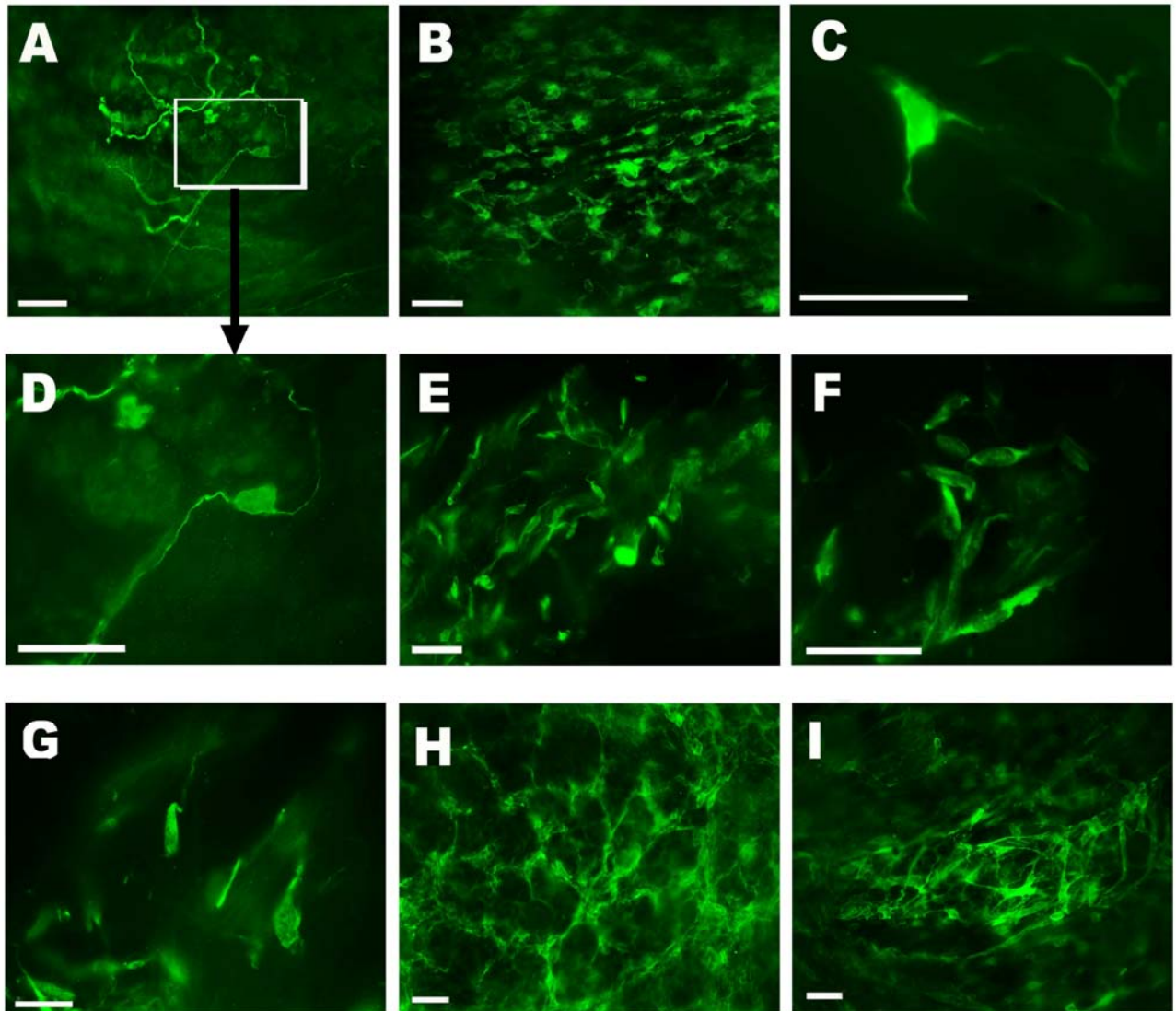


Figura 123. Detalle de estructuras inmunorreactivas a cGMP en la lámina propia de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. **A** y **D**. Troncos nerviosos y ganglios intramurales en zona proximal de SAM-P8. **B**. ICCs estrelladas en zona proximal de SAM-P8. En **C** se muestra un detalle de una ICC estrellada. **E-G**. ICCs fusiformes en zona medial de SAM-R1. **H**. ICCs suburoteliales en zona medial de SAM-R1. **I**. Vaso rodeado de células (posibles pericitos) en zona medial de SAM-R1. Barra = 25 μ m.

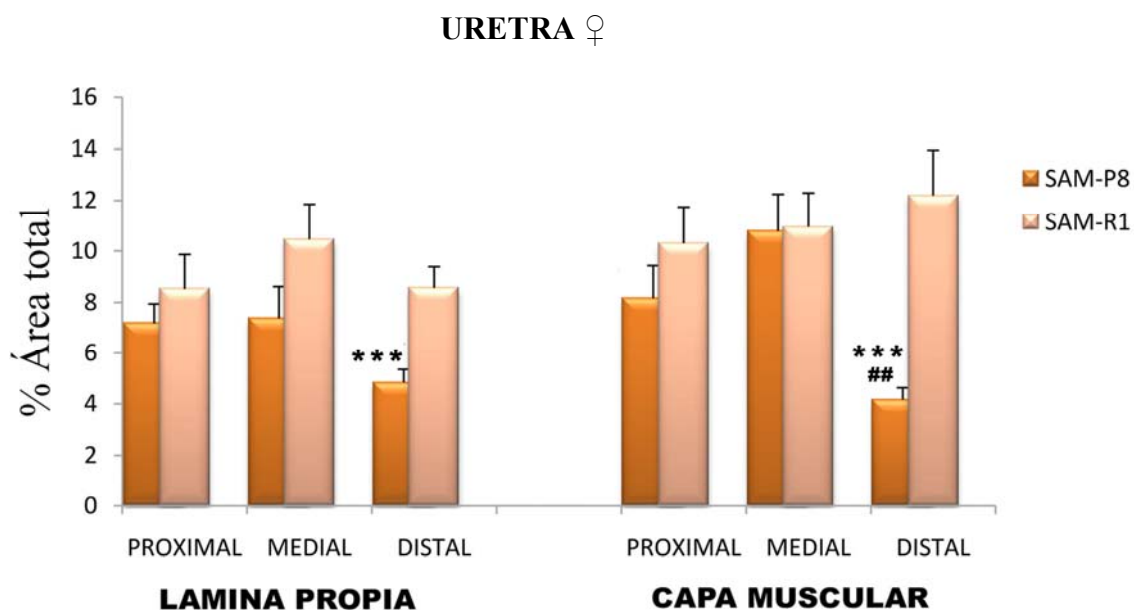


Figura 124. Cuantificación de la inmunorreactividad a cGMP en diferentes regiones uretrales de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8 inducida por la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM). Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y ## $p<0,01$ respecto a la zona distal.

4.3.7.2. Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa con ODQ

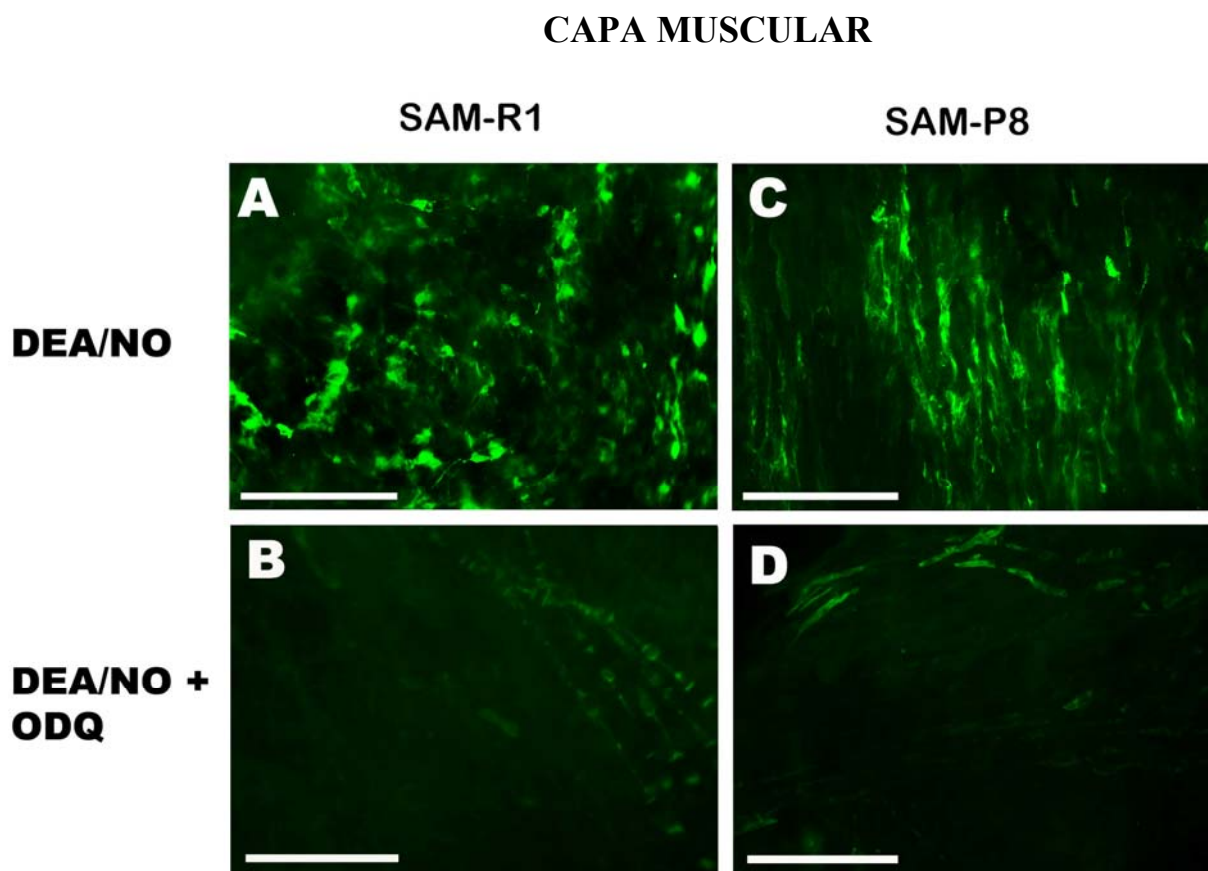


Figura 125. Inmunorreactividad a cGMP en preparaciones *whole-mount* de capa muscular de la región medial de uretra hembra SAM-R1 (**A**, **B**) y SAM-P8 (**C**, **D**) sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM) en ausencia (**A**, **C**) y presencia de ODQ (0,1 mM) (**B**, **D**). Se puede apreciar la drástica disminución de inmunorreactividad a cGMP en las preparaciones incubadas con ODQ con respecto a las estimuladas en ausencia del inhibidor y ensayadas el mismo día. Barra = 100 μ m.

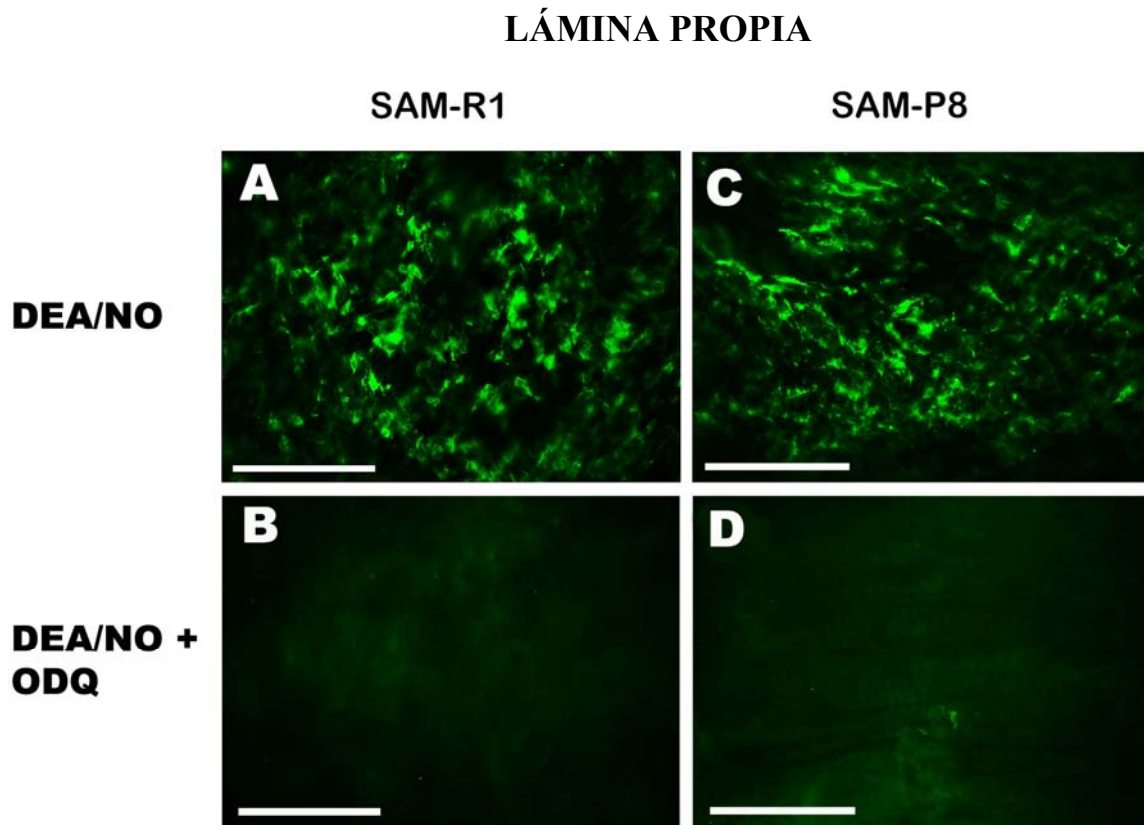


Figura 126. Inmunorreactividad a cGMP en preparaciones *whole-mount* de lámina propia de la región medial de uretra hembra SAM-R1 (**A**, **B**) y SAM-P8 (**C**, **D**) sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM) en ausencia (**A**, **C**) y presencia de ODQ (0,1 mM) (**B**, **D**). Se puede apreciar la drástica disminución de inmunorreactividad a cGMP en las preparaciones incubadas con ODQ con respecto a las estimuladas en ausencia del inhibidor y ensayadas el mismo día. Barra = 100 μ m.

CAPA MUSCULAR

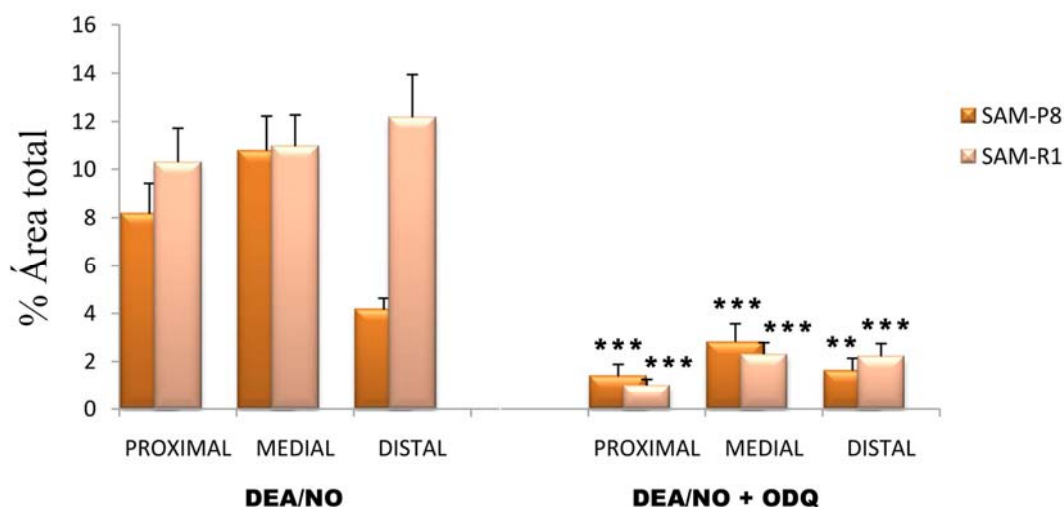


Figura 127. Cuantificación de la inmunorreactividad a cGMP en diferentes regiones de la capa muscular de uretra de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8 inducida por DEA/NO (0,1 mM) en presencia y ausencia de ODQ (0,1 mM). Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a DEA/NO.

LÁMINA PROPIA

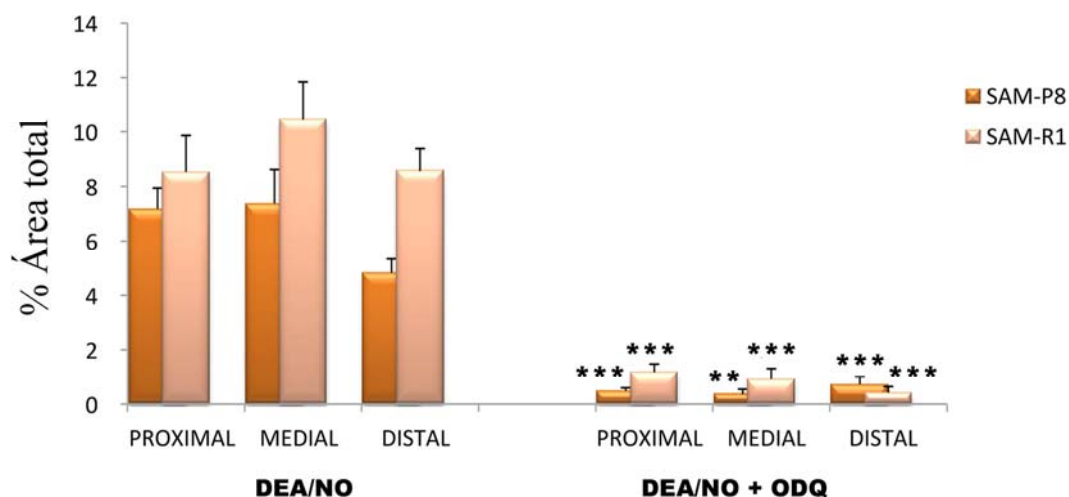


Figura 128. Cuantificación de la inmunorreactividad a cGMP en diferentes regiones de la lámina propia de uretra de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8 inducida por la adición de DEA/NO (0,1 mM) en presencia (derecha) y ausencia (izquierda) de ODQ (0,1 mM). Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ señala diferencias respecto a DEA/NO.

4.3.7.3. Inmunorreactividad control en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas

CAPA MUSCULAR

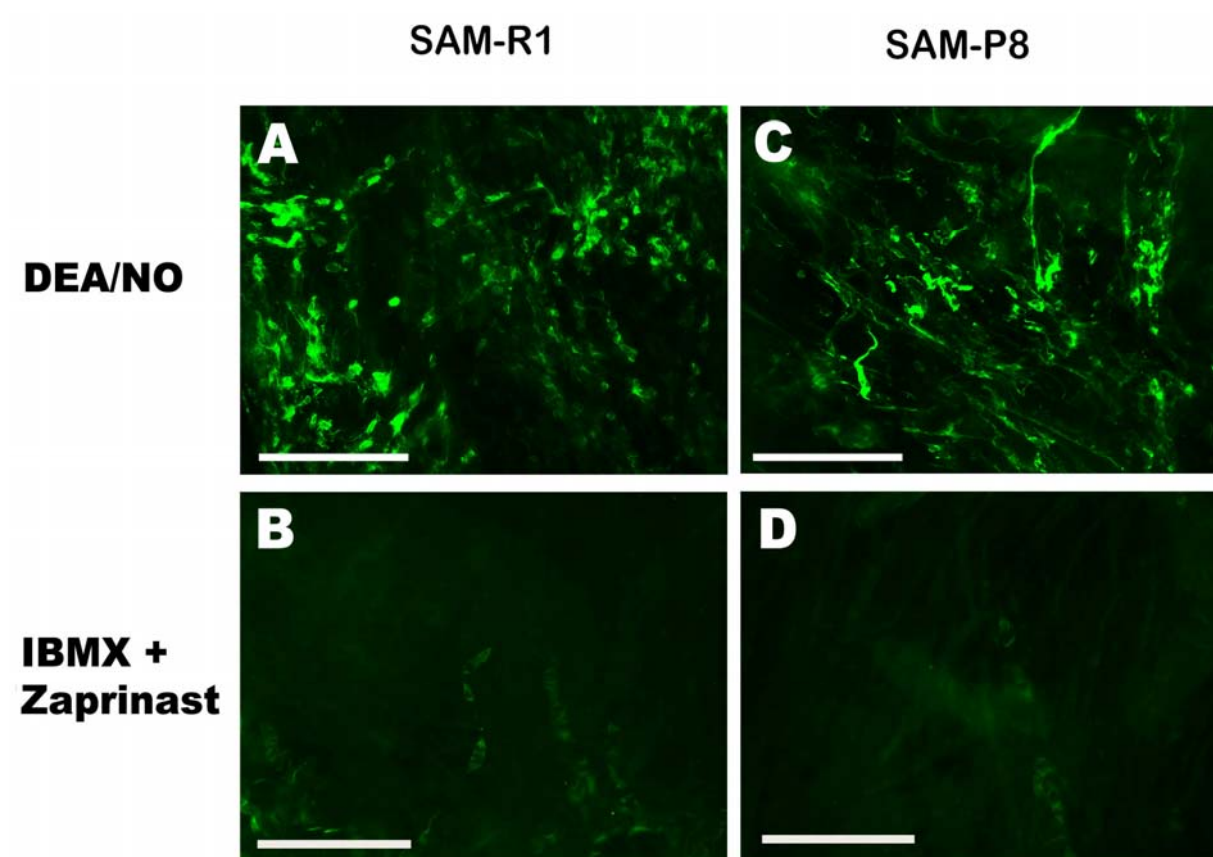


Figura 129. Inmunorreactividad a cGMP en preparaciones *whole-mount* de la capa muscular de la región medial de uretra hembra SAM-R1 (**A**, **B**) y SAM-P8 (**C**, **D**) sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM) en **A** y **C**, y en presencia exclusivamente de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) en **B** y **D**. Se puede apreciar la baja inmunorreactividad a cGMP en presencia de IBMX y Zaprinast sólo (**B** y **D**), en comparación con la provocada por la presencia adicional de DEA/NO (**A** y **C**) en preparaciones ensayadas en el mismo día. Barra = 100 μ m.

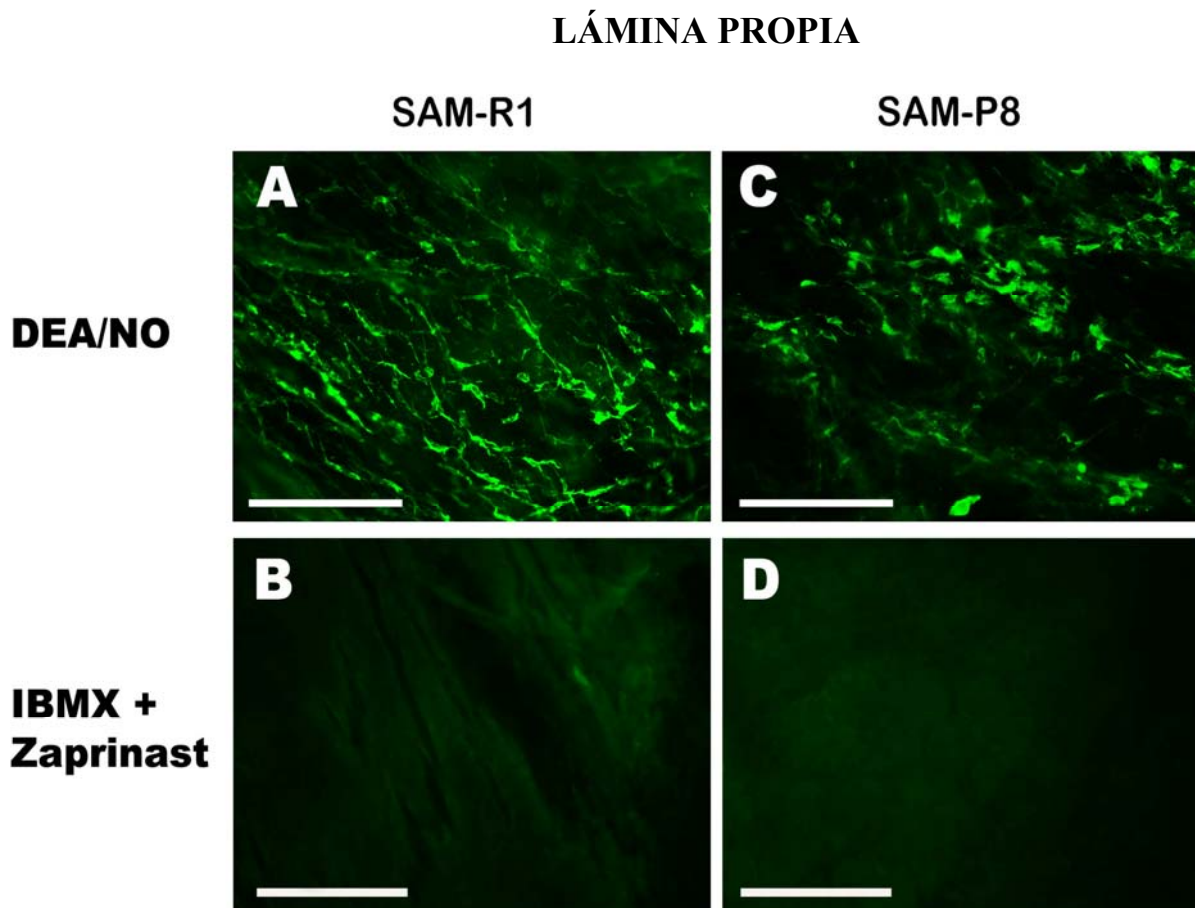


Figura 130. Inmunorreactividad a cGMP en preparaciones *whole-mount* de la lámina propia de la región medial de uretra hembra SAM-R1 (**A**, **B**) y SAM-P8 (**C**, **D**) sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM) en **A** y **C**, y en presencia exclusivamente de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) en **B** y **D**. Se puede apreciar la baja inmunorreactividad a cGMP en presencia de IBMX y Zaprinast sólo (**B** y **D**), en comparación con la provocada por la presencia adicional de DEA/NO (**A** y **C**) en preparaciones ensayadas en el mismo día. Barra = 100 μ m.

CAPA MUSCULAR

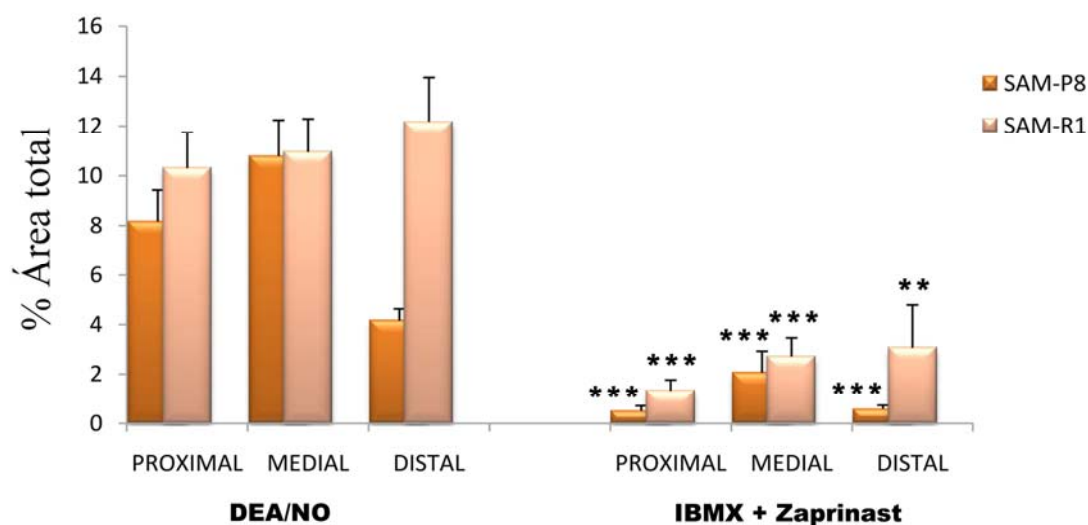


Figura 131. Cuantificación de la inmunorreactividad a cGMP en diferentes regiones de capa muscular de uretra de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8 en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) sólo (derecha), en comparación con la provocada por la presencia adicional de DEA/NO (0,1 mM; izquierda). Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ señala diferencias respecto a DEA/NO.

LÁMINA PROPIA

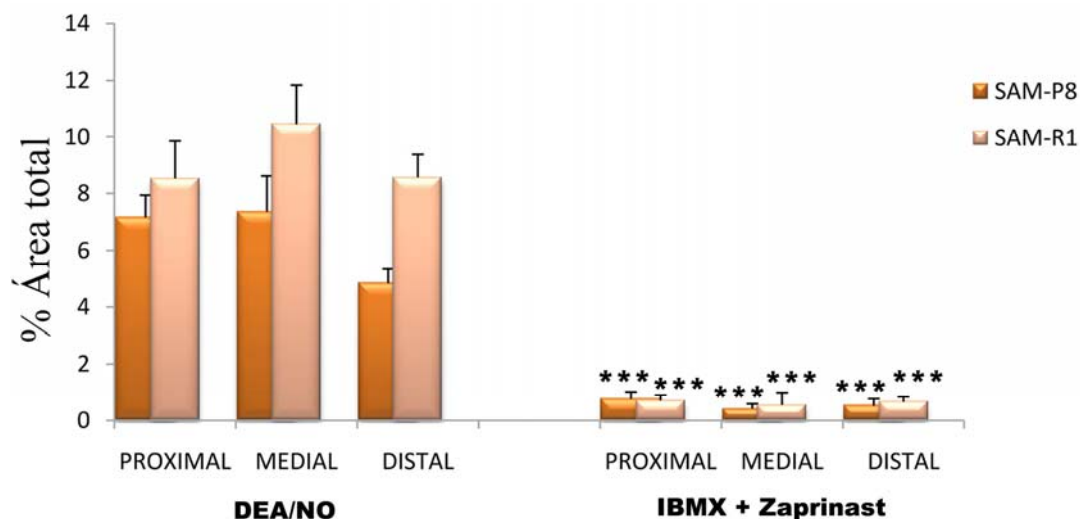


Figura 132. Cuantificación de la inmunorreactividad a cGMP en diferentes regiones de la lámina propia de uretra de ratones hembra SAM-R1 y SAM-P8 en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) sólo (derecha), en comparación con la provocada por la presencia adicional de DEA/NO (0,1 mM; izquierda). Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 8-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). *** $p<0,001$, señala diferencias con DEA/NO.

4.3.8. Estudios de colocalización en la uretra

4.3.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores en nervios intramurales

a) Acetilcolina (VAcHT)- NO (nNOS)

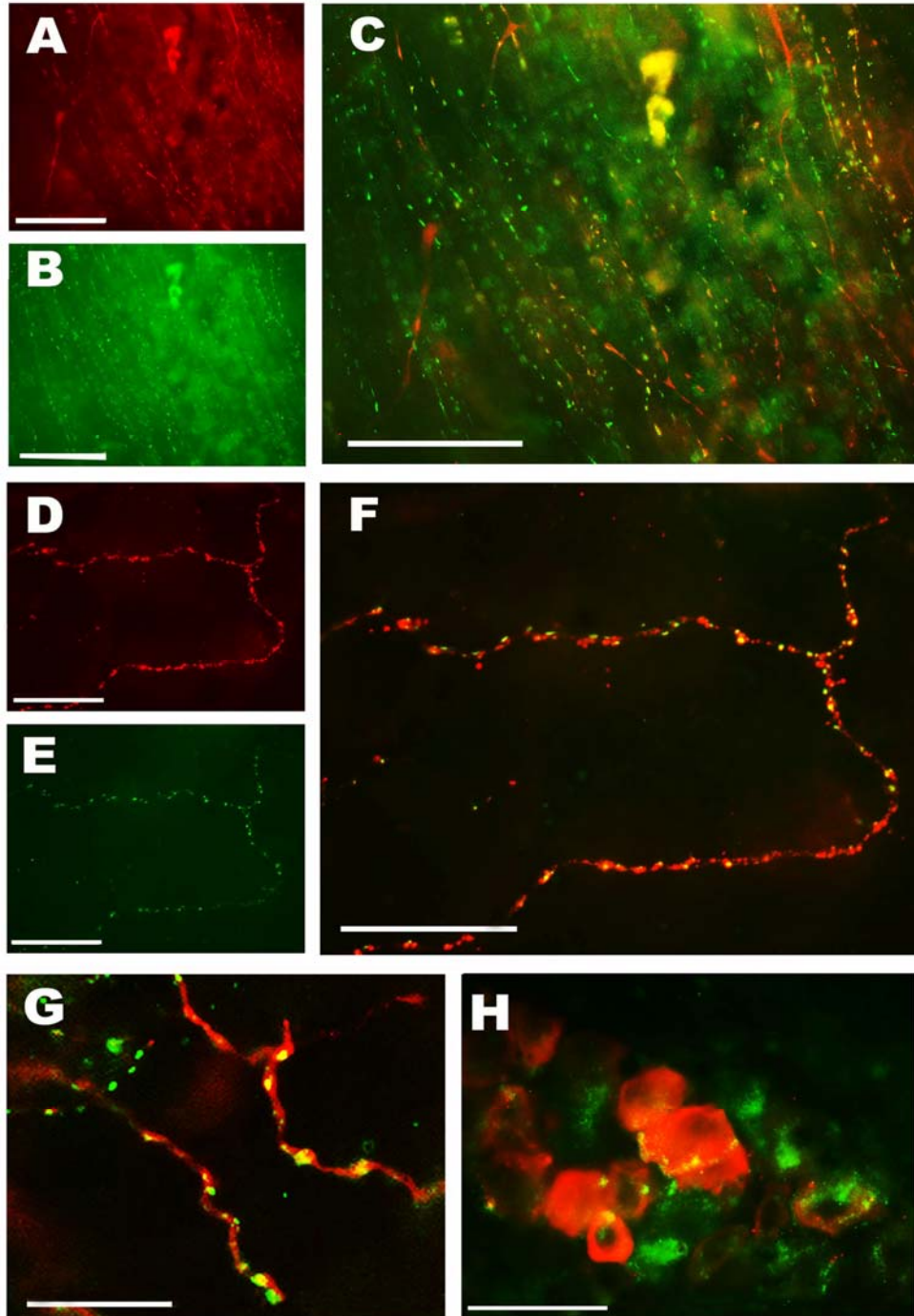


Figura 133. Doble marcaje para VAcHT (verde) y nNOS (rojo) en preparaciones *whole-mount* de uretra hembra SAM-P8. **A-C** y **H**: Zona proximal de capa muscular; **D-F** y **G**: Zona proximal de lámina propia. Puede observarse la colocalización de ambos marcadores en varicosidades nerviosas y en ganglios intramurales. Barra = 50 μm (**A-C** y **D-F**) y 25 μm (**G** y **H**).

b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)

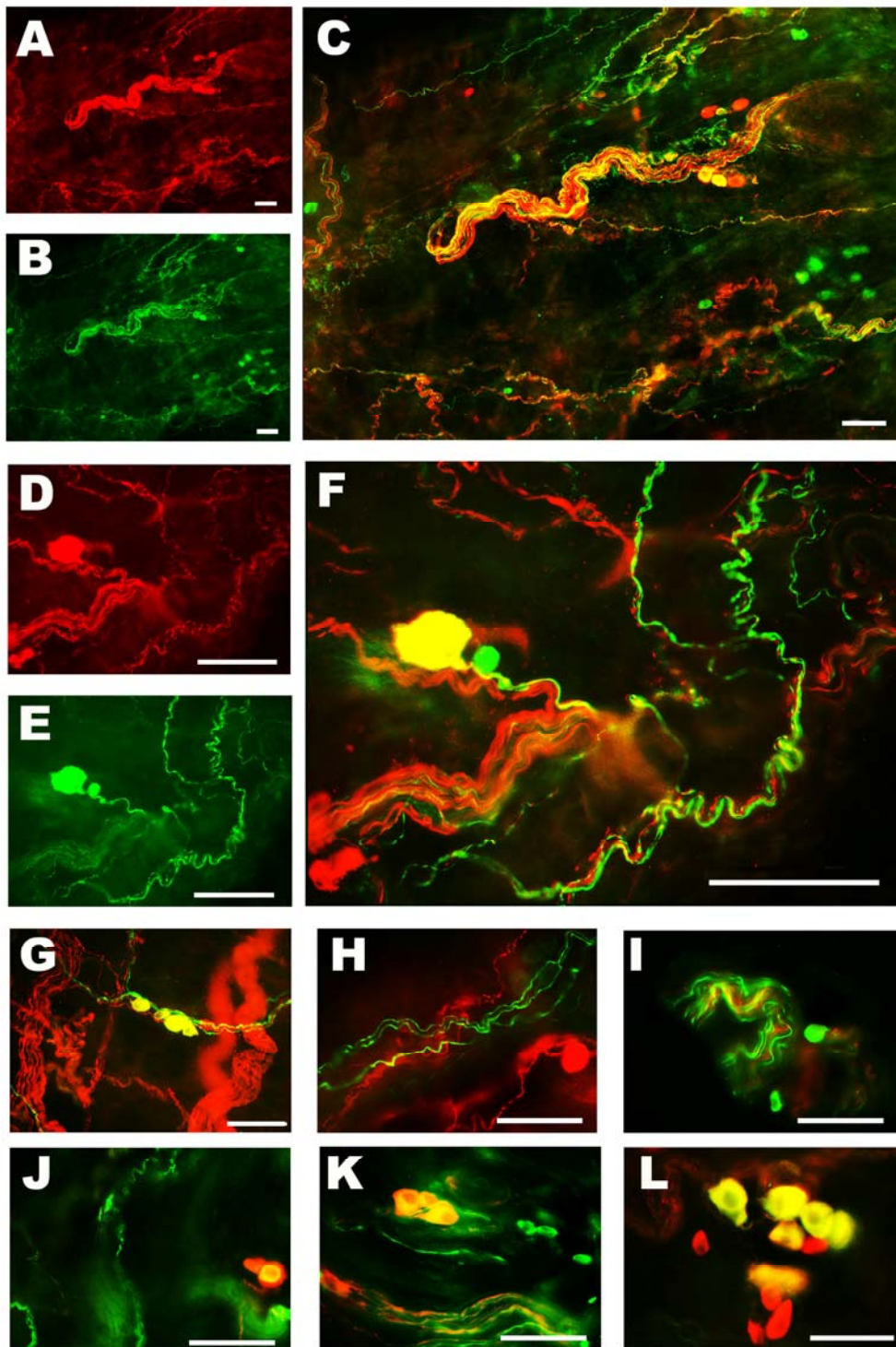


Figura 134. Doble marcaje para TSH (verde) y nNOS (rojo) en preparaciones *whole-mount* de capa muscular de uretra hembra SAM-R1 y SAM-P8. **A-C.** Zona medial de SAM-P8. **D-F y K.** Zona proximal de SAM-P8. **G, H y L:** Zona proximal de SAM-R1. **I y J:** Zona medial de SAM-R1. Se puede observar la colocalización en algunas células ganglionares y gruesos troncos nerviosos, mientras que ambos marcadores discurren en nervios independientes. Barra = 50 μ m.

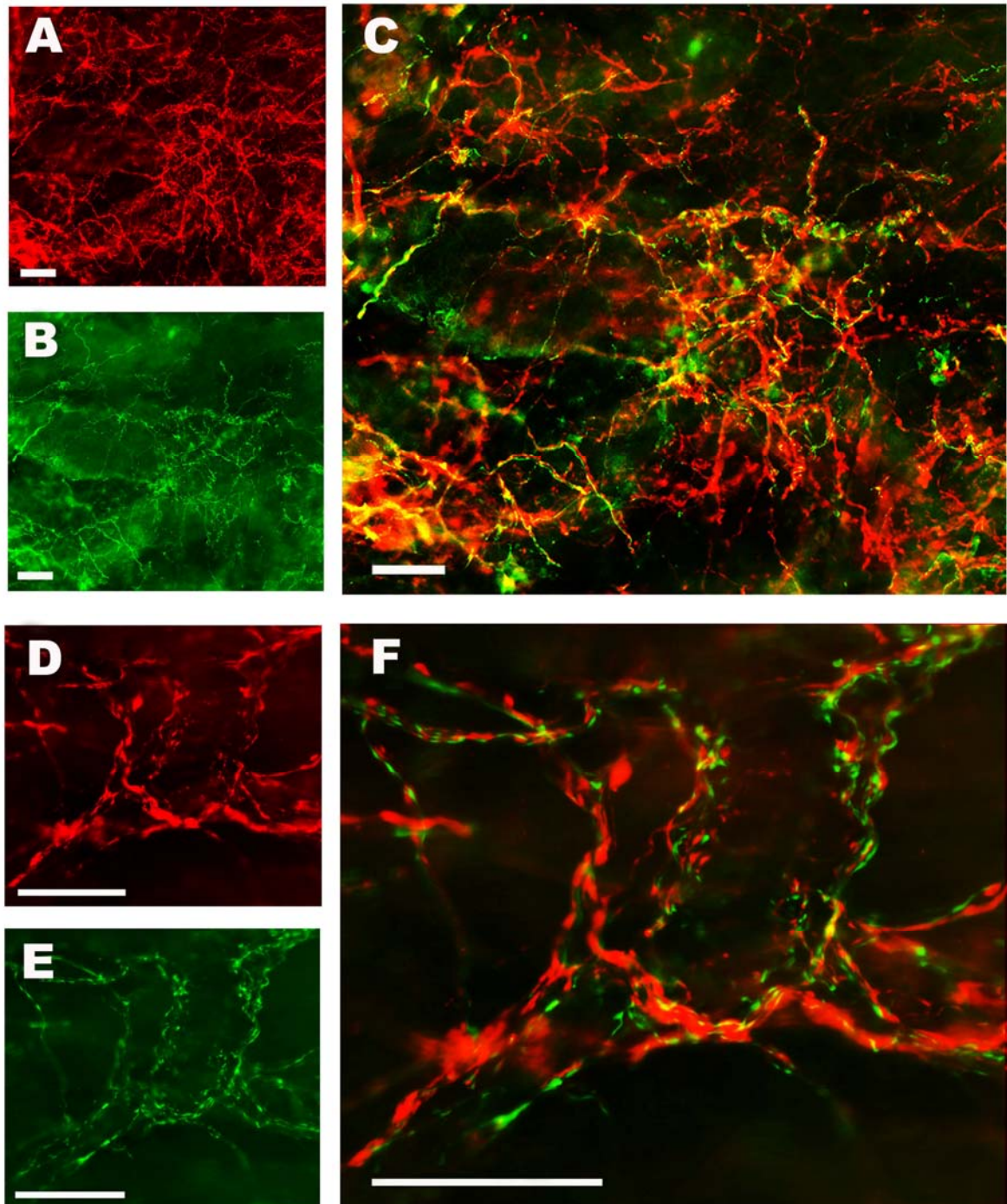
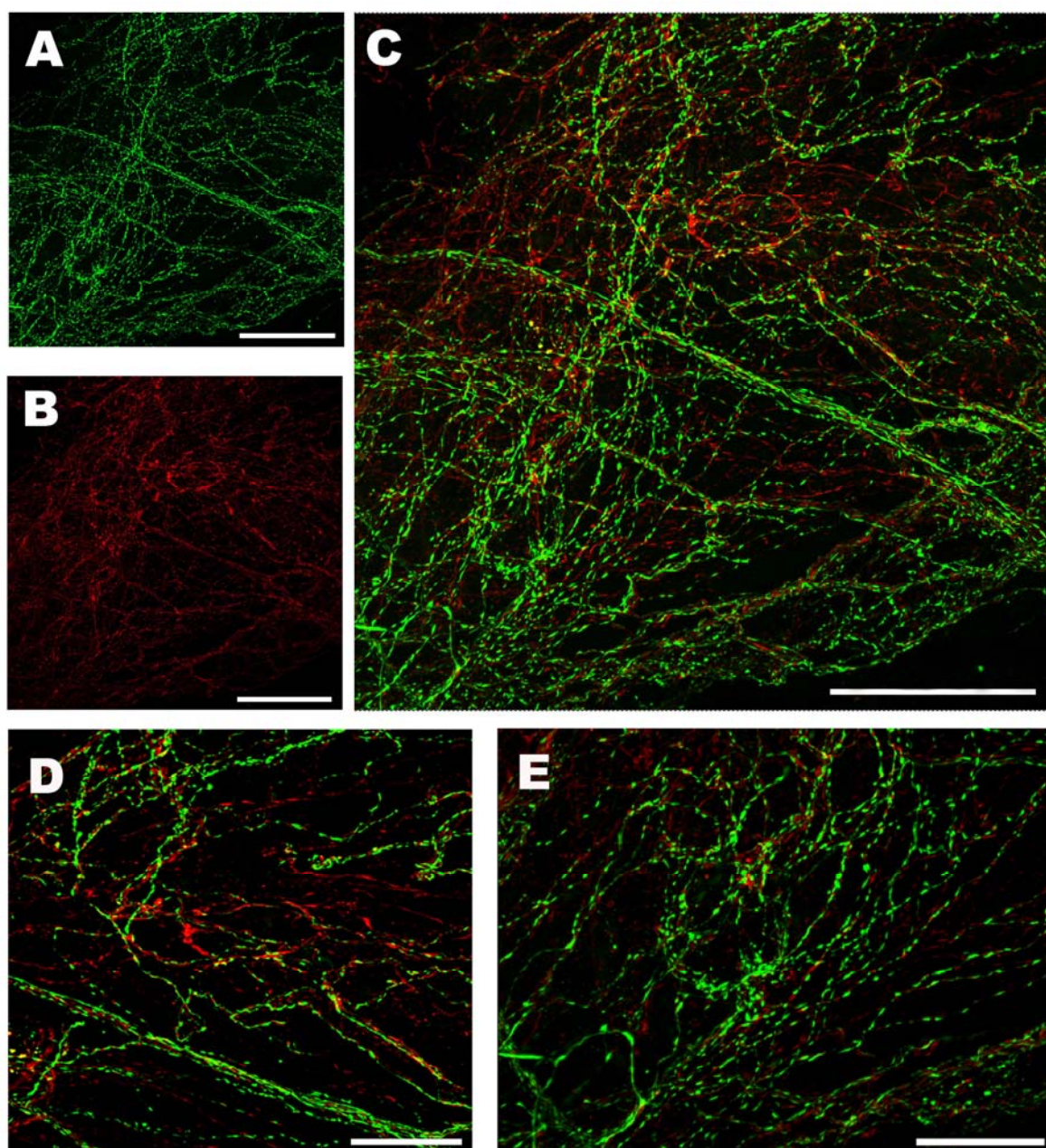


Figura 135. Doble marcaje para TSH (verde) y nNOS (rojo) en preparaciones *whole-mount* de lámina propia de uretra hembra SAM-R1 y SAM-P8. **A-C.** Zona distal de SAM-P8. **D-F.** Zona proximal de SAM-P8. En **A-C** se observa aparente colocalización en algunas terminaciones nerviosas pero no en otras. A mayores aumentos (**D-F**) se aprecia como ambos marcadores se localizan en nervios independientes que discurren estrechamente relacionados entre sí. Barra = 50 μ m.



F: Uretra hembra SAM-R1.avi

Figura 136. Imágenes (A-E) y vídeo de la reconstrucción 3D de imágenes (F) de microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de la lámina propia de la zona proximal de la uretra de hembra SAM-R1. Se ha realizado un doble marcaje para TSH (verde) y nNOS (rojo). A-C. Proyección Z de 41 planos de 2 µm cada uno. Se observa una ausencia total de colocalización de ambos marcadores en la densa red de nervios intramurales de la submucosa. D y E. Proyección Z de 17 planos de dos zonas de esta misma preparación a mayores aumentos. F. Reconstrucción 3D de 33 de los 41 planos (2 µm cada uno) que forman la imagen fija C. Barra = 50 µm (A, B y C) y 25 µm (D y E).

4.3.8.2. Relaciones entre nervios intramurales e ICCs

a) Acetilcolina (VACHT)- ICCs (Vimentina)

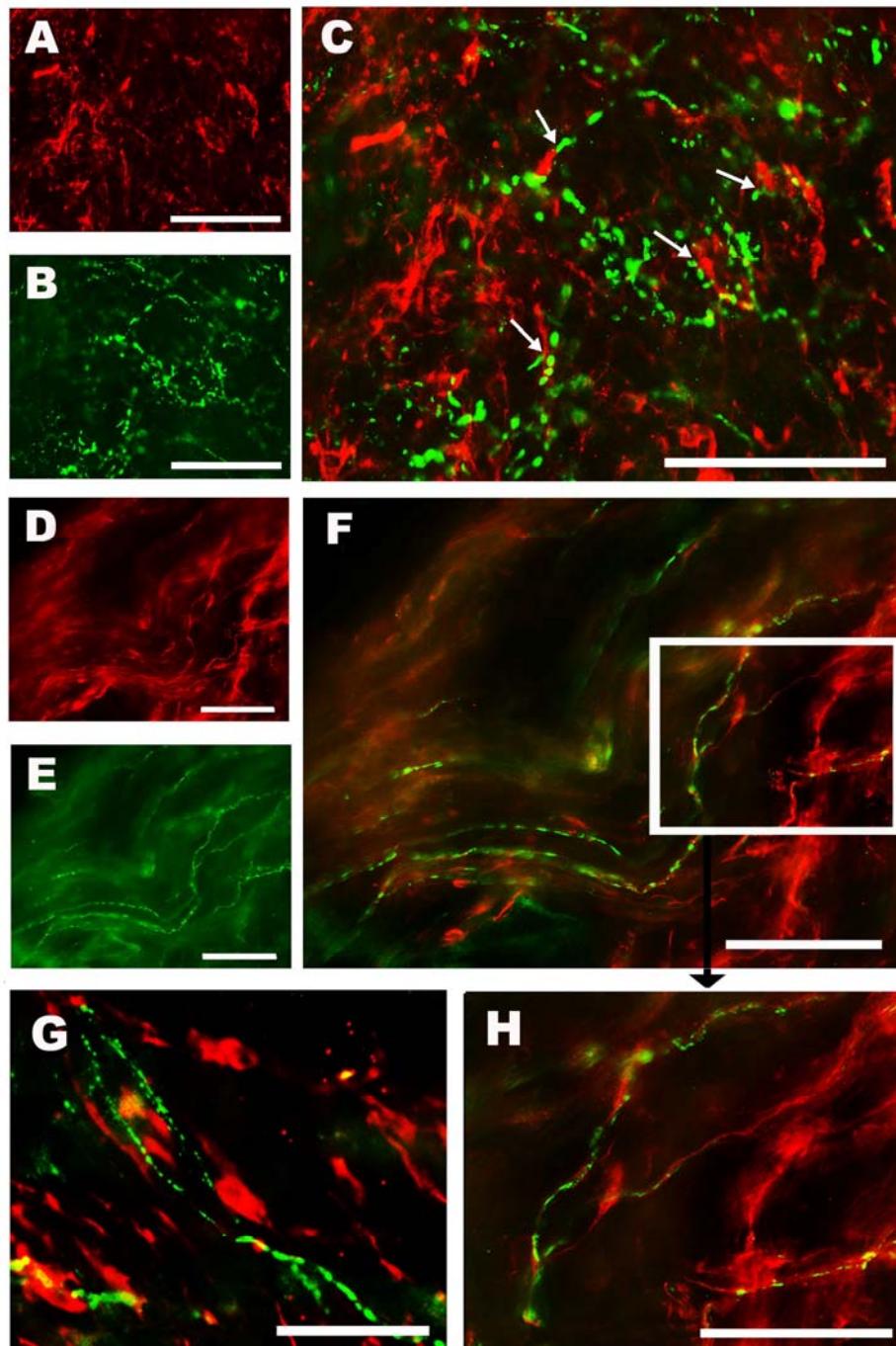


Figura 137. Doble marcaje para ACh (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de lámina propia y capa muscular de uretra de hembras SAM-R1 y SAM-P8. **A-C** y **G**. Zona proximal de capa muscular de SAM-R1. **D-F** y **H**. Zona medial de lámina propia de SAM-R1. Se puede apreciar la disposición paralela de ambos marcajes y la existencia de numerosos puntos de contacto entre ICCs y nervios colinérgicos, algunos señalados con flechas. Barra = 50 μm (**A-C** y **D-F**) y 25 μm (**G** y **H**).

b) Noradrenalina (TSH)- ICCs (Vimentina)

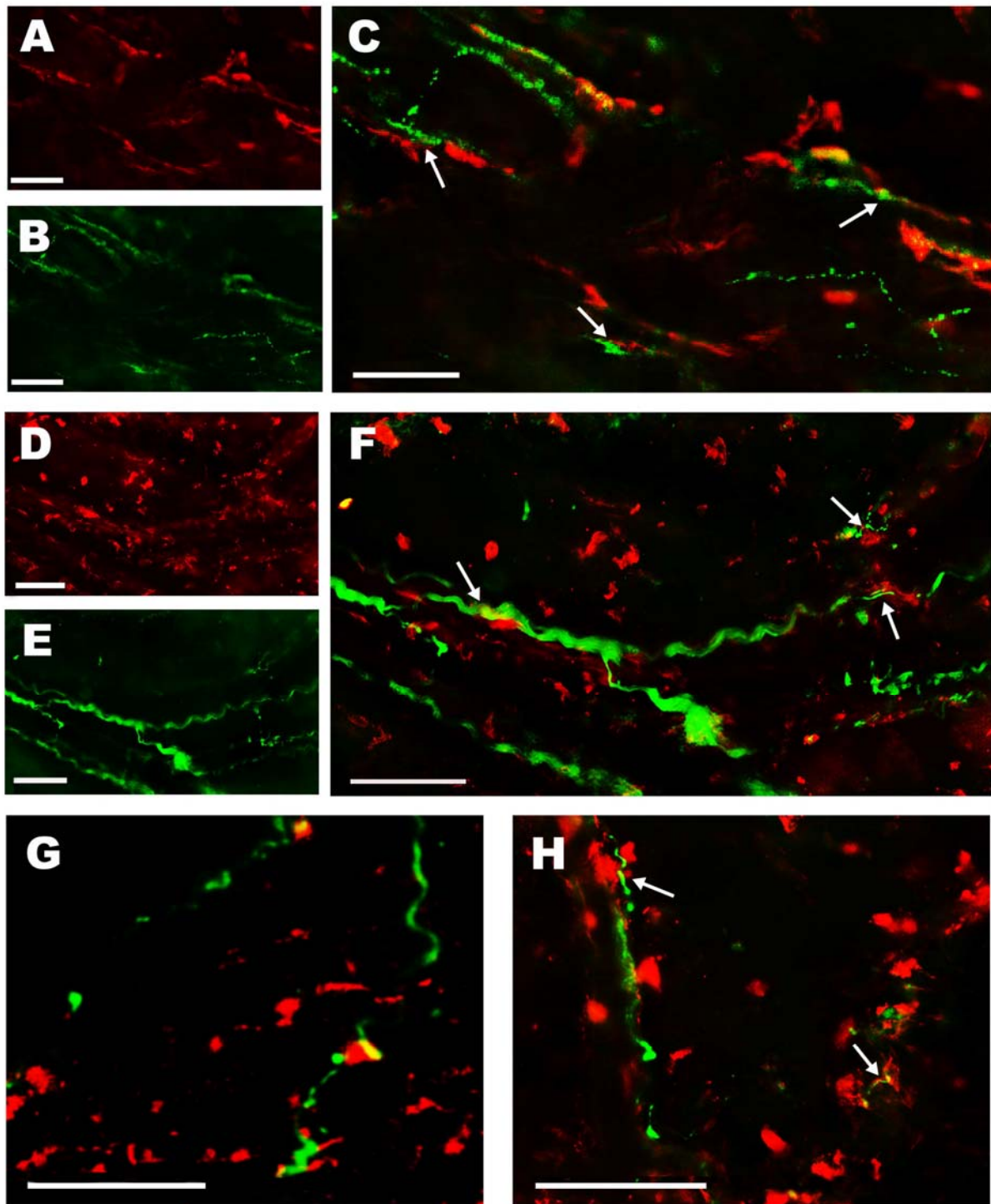


Figura 138. Doble marcaje para TSH (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de lámina propia y capa muscular de uretra hembra SAM-P8. **A-C** y **G**. Zona proximal de capa muscular. **D-F** y **H**. Zona proximal de lámina propia. Se observan también contactos estrechos entre ICCs y nervios adrenérgicos, algunos señalados con flechas. Algunas ICCs también son positivas para TSH (**D-F**). Barra = 50 μm (**A-C** y **D-F**) y 25 μm (**G-H**).

4.3.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP

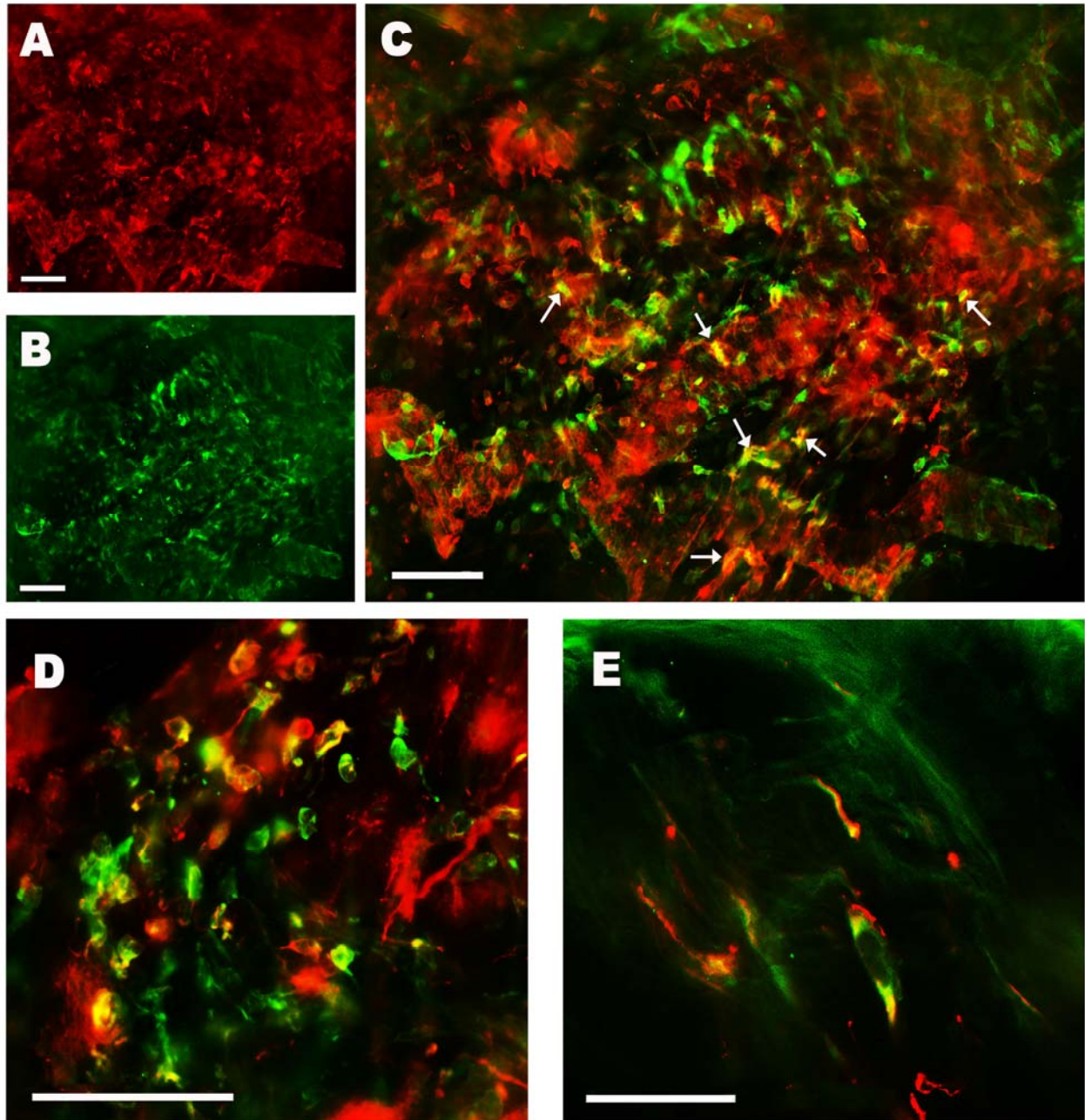


Figura 139. Doble marcaje por inmunorreactividad a cGMP (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de capa muscular de uretra hembra SAM-R1. **A-C.** Zona distal. **D** y **E.** Zona proximal. Las preparaciones uretrales han sido sometidas a tratamiento previo con DEA/NO. Las flechas señalan la colocalización clara de ambos marcadores en algunas ICCs, pero no en todas. Destaca la existencia de algunas ICCs aparentemente positivas a vimentina pero no a cGMP y viceversa. Nótese en **E** como en la misma célula, el marcaje de vimentina es más periférico tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones, mientras que el marcaje de cGMP se localiza en el citoplasma. Barra = 50 μ m (**A-C** y **D**) y 25 μ m (**E**).

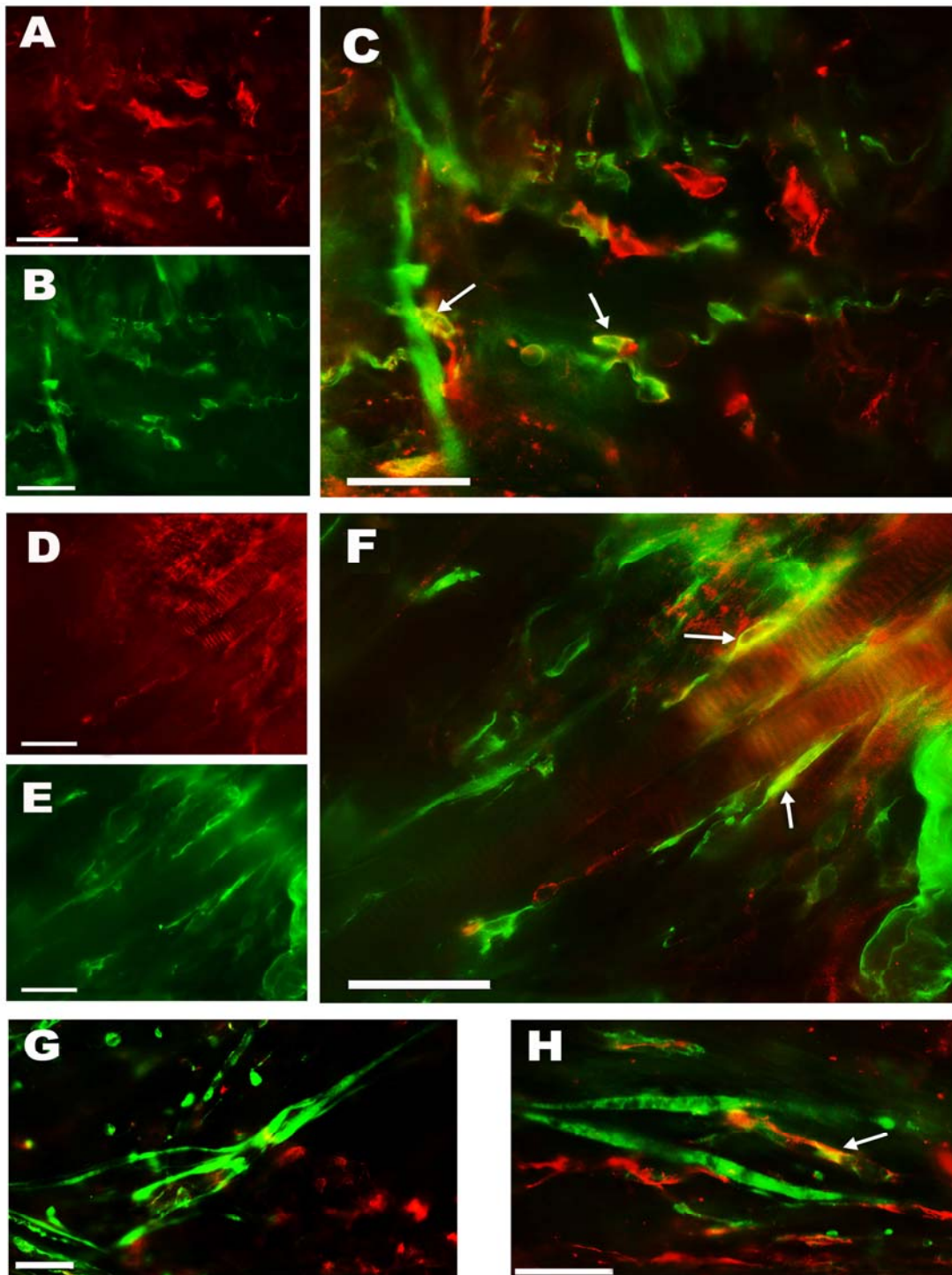


Figura 140. Doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de capa muscular de uretra hembra SAM-P8. Las preparaciones uretrales han sido sometidas a tratamiento previo con DEA/NO. **A-C** y **H**. Zona proximal. **D-F** y **G**. Zona medial. Predominan las ICCs bipolares con largas prolongaciones, en ocasiones paralelas a las fibras musculares lisas positivas a cGMP (**H**). Las flechas señalan la colocación de ambos marcadores en el citoplasma de algunas ICCs. En **D-F** se pueden observar algunas de estas ICCs positivas a vimentina y a cGMP, envolviendo a fibras estriadas. Barra= 25 μm (**A-C**, **D-F** y **G**) y 13 μm (**H**).

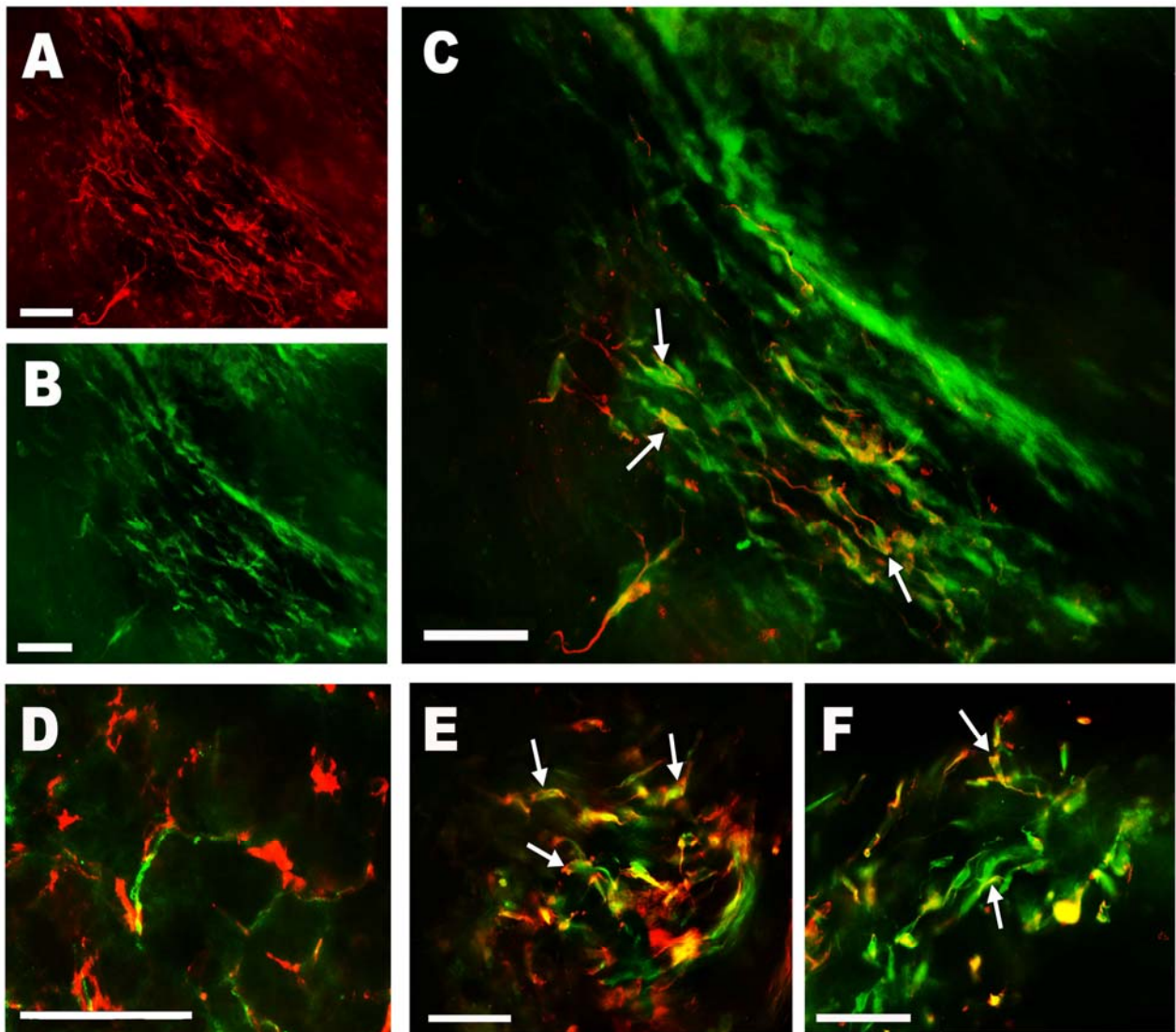


Figura 141. Doble marcaje por para cGMP (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de lámina propia de uretra hembra SAM-R1. Las preparaciones uretrales han sido sometidas a tratamiento previo con DEA/NO. **A-C.** Zona proximal. **D-F.** Zona medial. Se pueden apreciar numerosas células que poseen colocalización de ambos marcadores. Nótese la colocalización en la zona periférica del cuerpo celular (flechas). Obsérvese en **D** la disposición de ICCs subepiteliales con prolongaciones inmunorreactivas a cGMP y vimentina. Barra = 50 μ m.

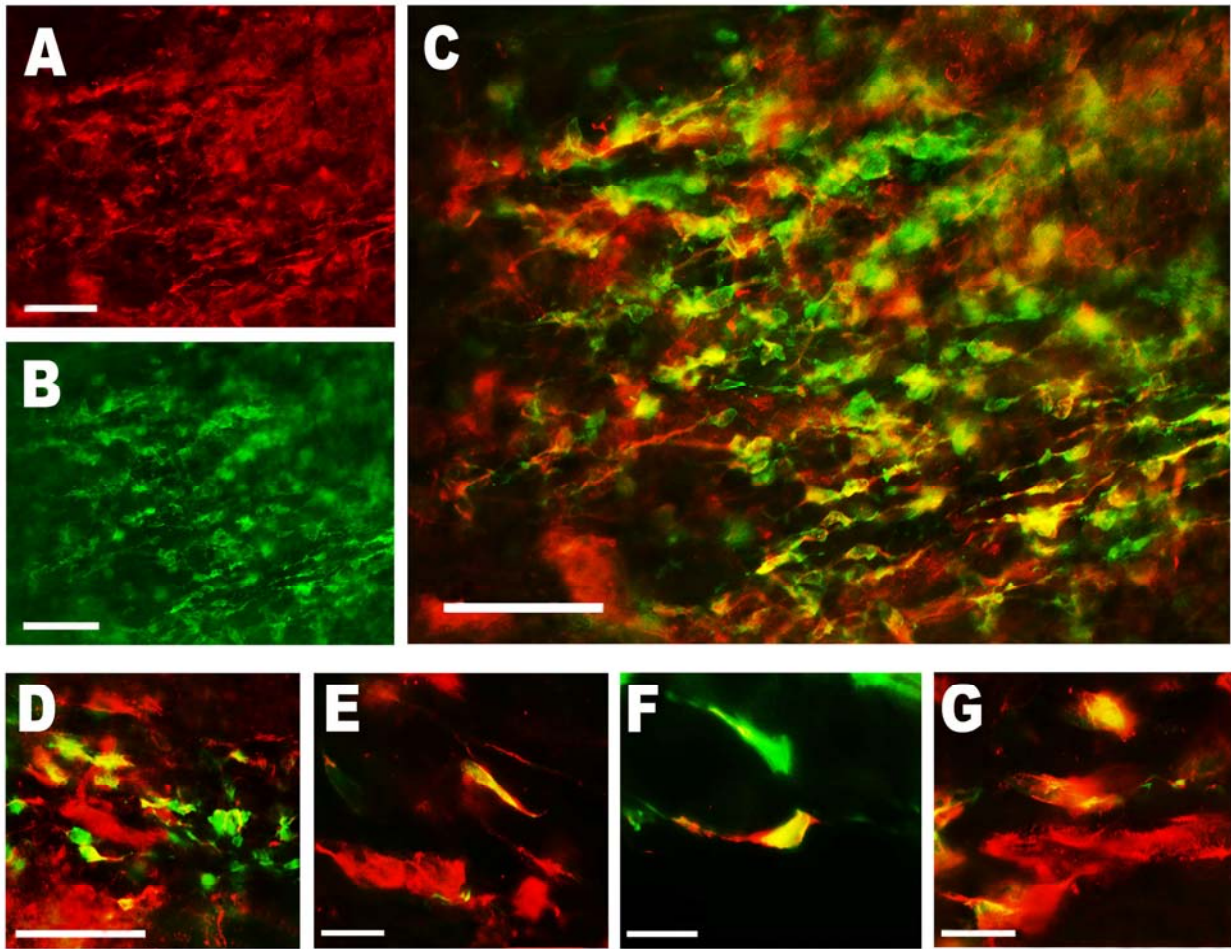
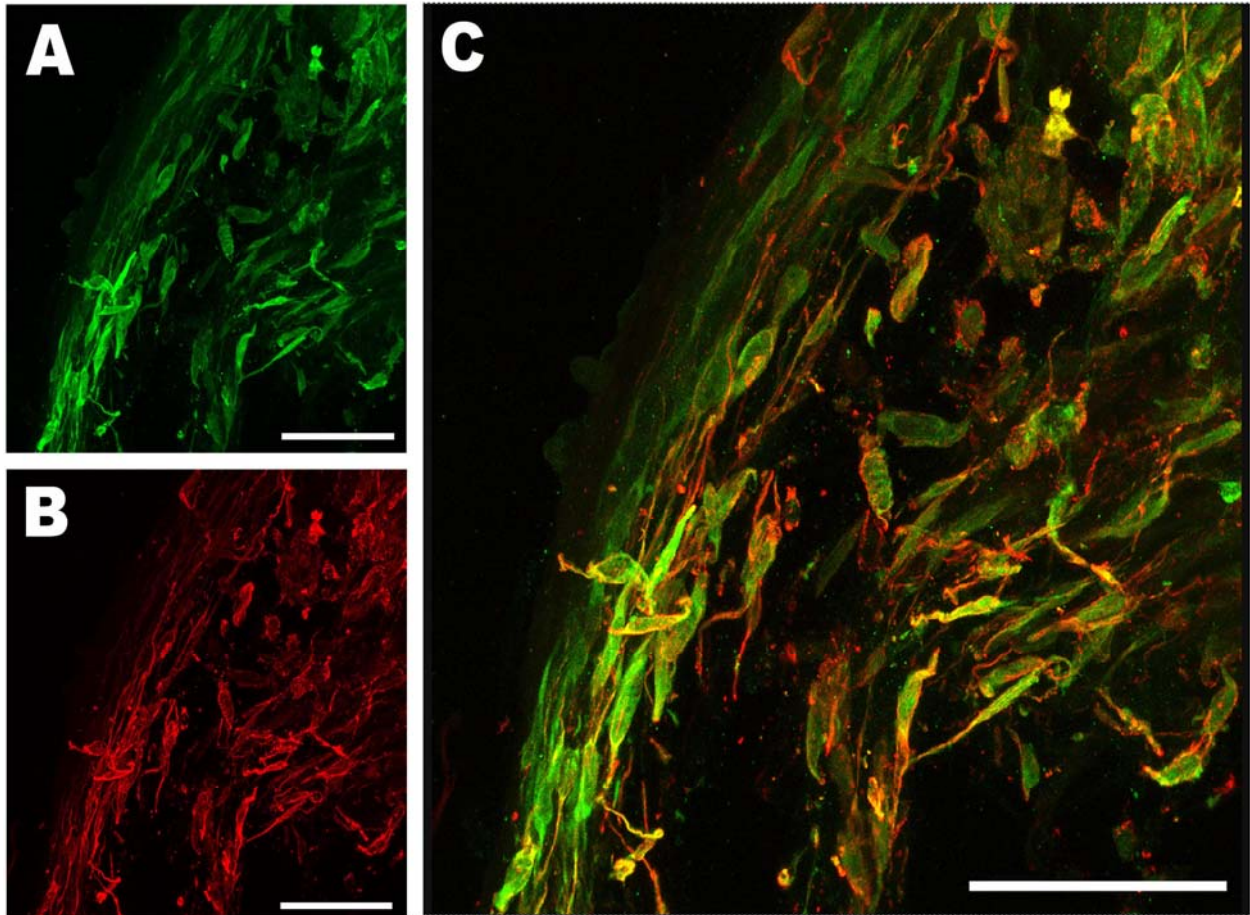


Figura 142. Doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de lámina propia de uretra hembra SAM-P8. Las preparaciones uretrales han sido sometidas a tratamiento previo con DEA/NO. **A-C, D y E.** Zona proximal. **F y G.** Zona medial. Similarmente a SAM-R1 se pueden apreciar numerosas células donde colocalizan ambos marcadores. En **E-G** se aprecia claramente la intensa colocalización en el citoplasma celular. Barra = 50 μm (**A-C y D**) y 13 μm (**E, F y G**).




D:  Uretra hembra SAM-R1.avi

Figura 143. Imágenes (A-C) y vídeo de la reconstrucción 3D de imágenes (D) de microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de la capa muscular de la zona proximal de la uretra de hembra SAM-R1. Se ha realizado un doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo). A-C. Proyección Z de 26 planos de 2 μ m cada uno. D. Reconstrucción 3D de 17 planos de 2 μ m cada uno. La preparación uretral ha sido sometida a tratamiento previo con DEA/NO. Como en anteriores fotografías se pueden apreciar numerosas células que poseen colocalización de ambos marcadores, principalmente en la zona periférica del cuerpo celular. Barra = 20 μ m.

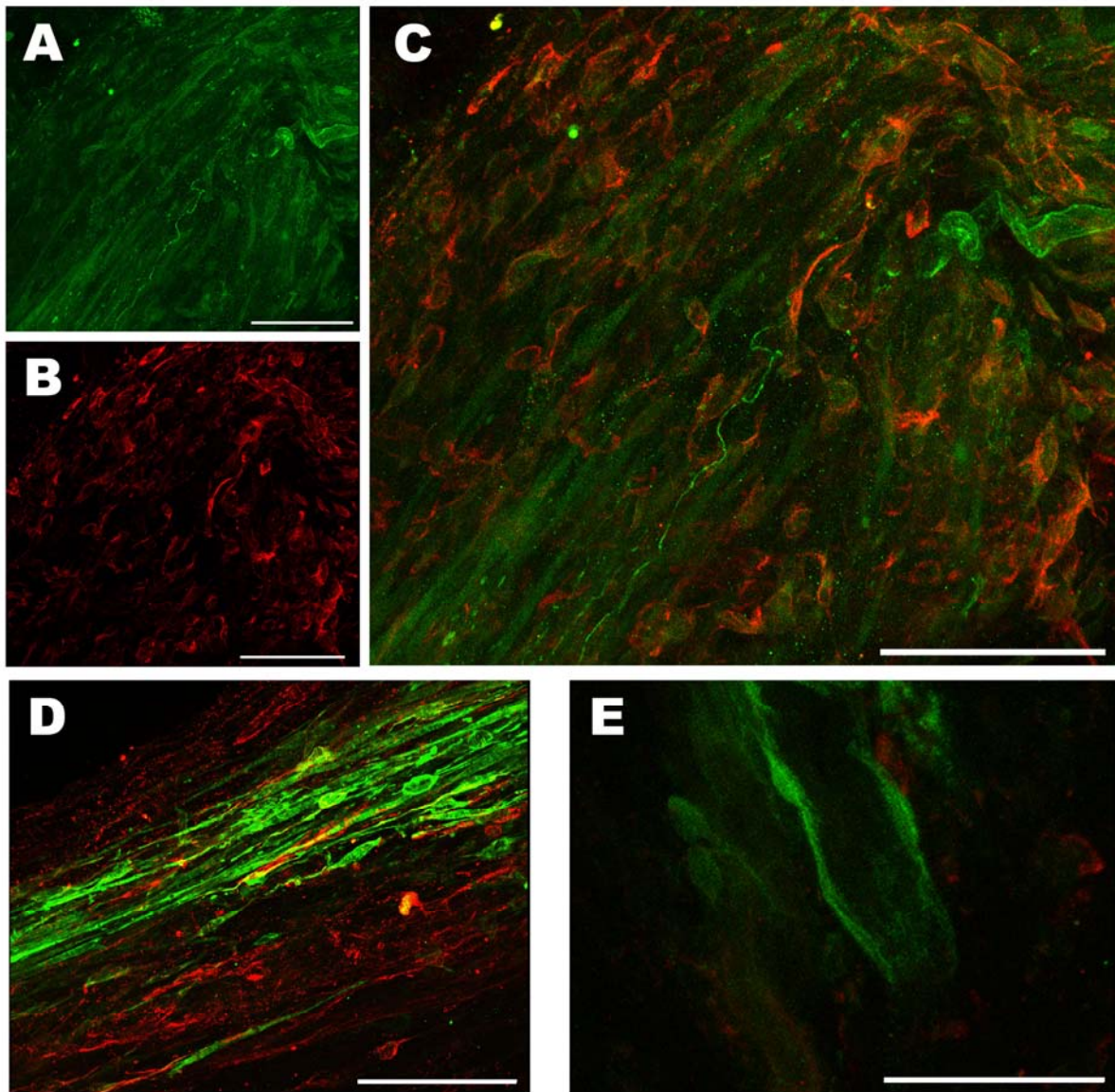
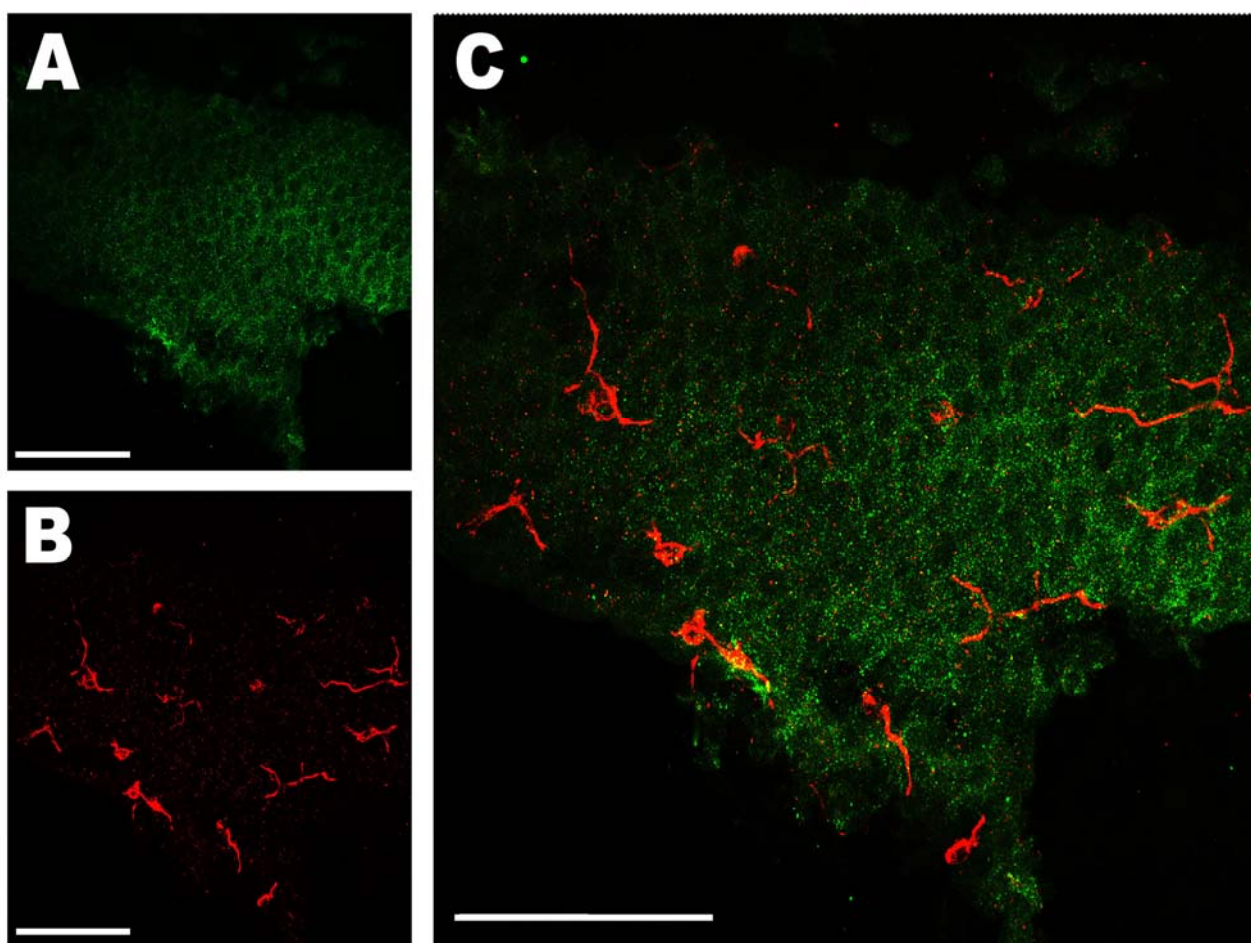


Figura 144. Imágenes de microscopía confocal de preparaciones *whole-mount* de la capa muscular de la zona medial de la uretra de hembra SAM-R1. Se ha realizado un doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo). Se muestra la proyección Z de 27 (A-C), 28 (D) y 10 (E) planos de 2 μm cada uno. La preparación uretral ha sido sometida a tratamiento previo con DEA/NO. Se pueden observar ICCs bipolares positivas a vimentina con largas prolongaciones colocándose paralelamente entre las fibras musculares lisas. Aparecen también algunas fibras nerviosas positivas a cGMP. En D aparecen ICCs positivas a vimentina pero no a cGMP y viceversa. En E observamos en detalle una posible ICC inmunorreactiva a cGMP pero no a vimentina. Barra = 20 μm (A-C y D) y 10 μm (E).



D: Uretra hembra SAM-R1.avi

Figura 145. Imágenes (A-C) y vídeo de la reconstrucción 3D de imágenes (D) de microscopía confocal de preparaciones *whole-mount* de la lámina propia de la zona medial de la uretra de hembra SAM-P8 (A-C) y SAM-R1 (D). Se ha realizado un doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo). Las preparaciones uretrales han sido sometidas a tratamiento previo con DEA/NO A-C. Proyección Z de 22 planos de 2 μm cada uno. Se puede observar la disposición de ICCs subepiteliales de forma estrellada en estrecho contacto con las células del urotelio. D. Reconstrucción 3D de 14 planos de 2 μm cada uno. Se aprecia una densa red de ICCs bipolares que poseen colocalización de ambos marcadores. Barra = 20 μm.

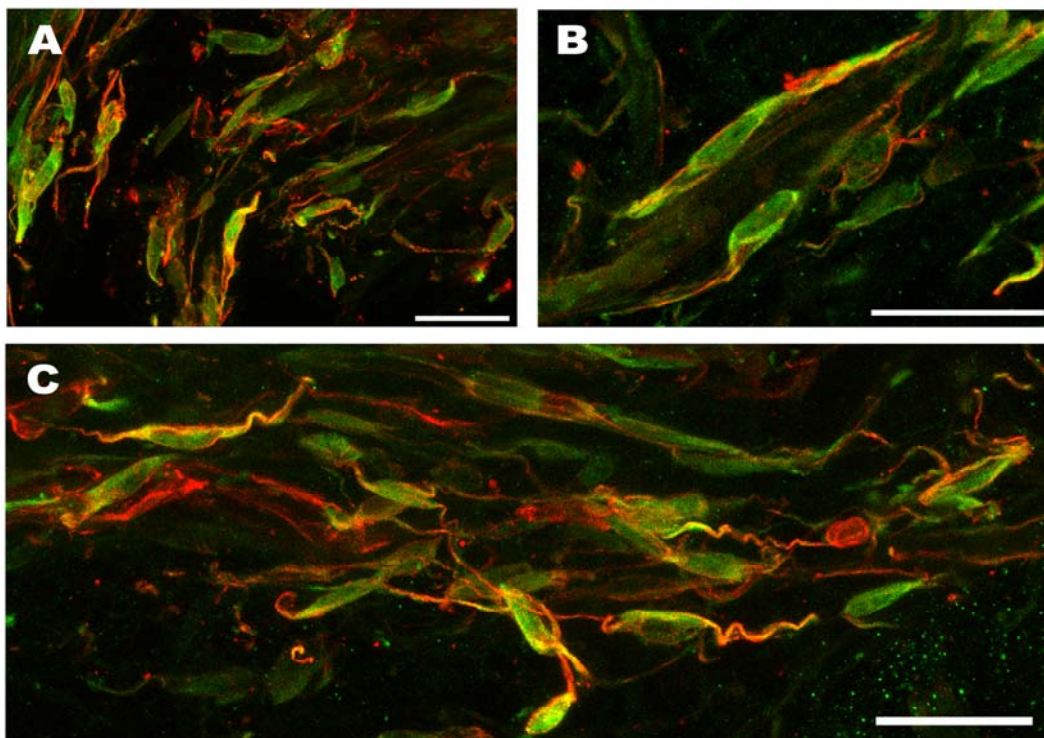


Figura 146. Imágenes de microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de la capa muscular de la zona proximal de la uretra de hembra SAM-R1 a mayores aumentos. Se ha realizado un doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo). Se muestra la proyección Z de 16 (A), 3 (B) y 10 (C) planos de 2 μm cada uno. La preparación uretral ha sido sometida a tratamiento previo con DEA/NO. Se muestra en detalle la morfología de ICCs positivas a ambos marcadores. Barra = 10 μm .

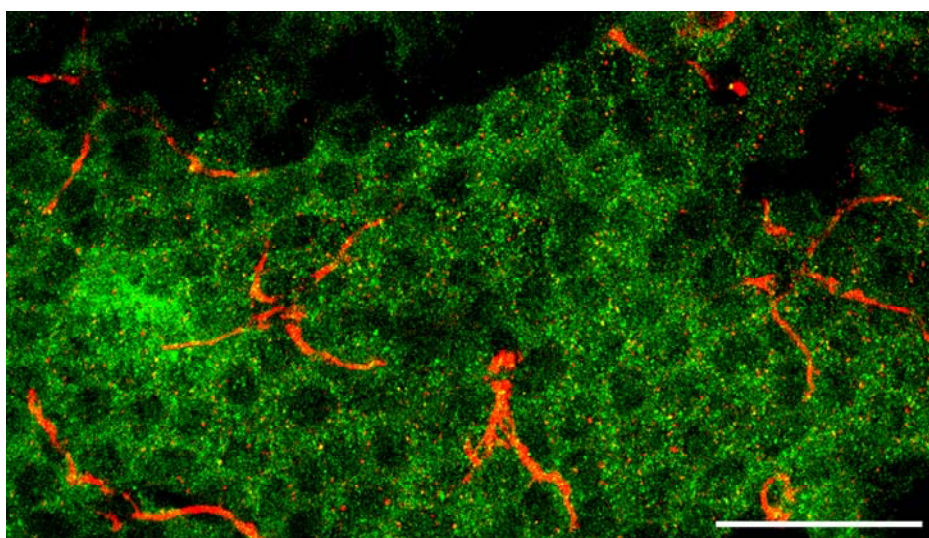


Figura 147. Imágenes de microscopía confocal de una preparación *whole-mount* de la lámina propia de la zona medial de la uretra de hembra SAM-P8 a mayores aumentos. Se ha realizado un doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo). Se muestra la proyección Z de 5 planos de 2 μm cada uno. La preparación uretral ha sido sometida a tratamiento previo con DEA/NO. Se aprecia la relación estrecha entre ICCs positivas a vimentina, pero no a cGMP, en contacto estrecho con las células epiteliales del urotelio, positivas a cGMP. Barra = 10 μm .

4.4. CUERPO CAVERNOSO

4.4. CUERPO CAVERNOSO: Cambios estructurales y funcionales en ratones SAM-P8 en comparación con SAM-R1

4.4.1. Cambios estructurales

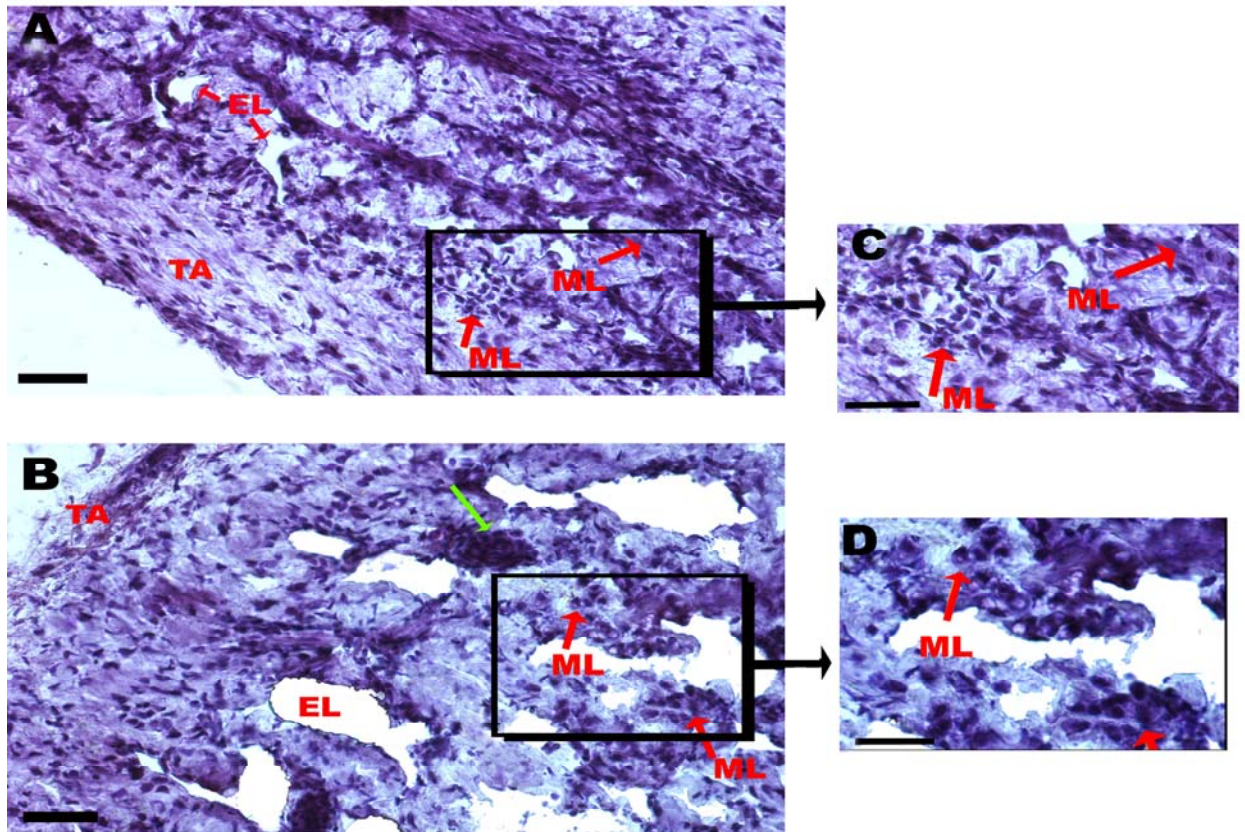


Figura 148. Microfotografías de cortes longitudinales de cuerpo cavernoso (10 μ m) teñidos con hematoxilina-eosina. **A** y **C**. SAM-R1. **B** y **D**. SAM-P8. TA: Túnica albugínea, EL: espacios lacunares, ML: Músculo liso. La flecha verde señala un vaso sanguíneo. Se puede observar como los espacios lacunares son de mayor calibre en SAM-P8 que en SAM-R1. Barra= 50 μ m.

4.4.2. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por una alta concentración de K^+ extracelular

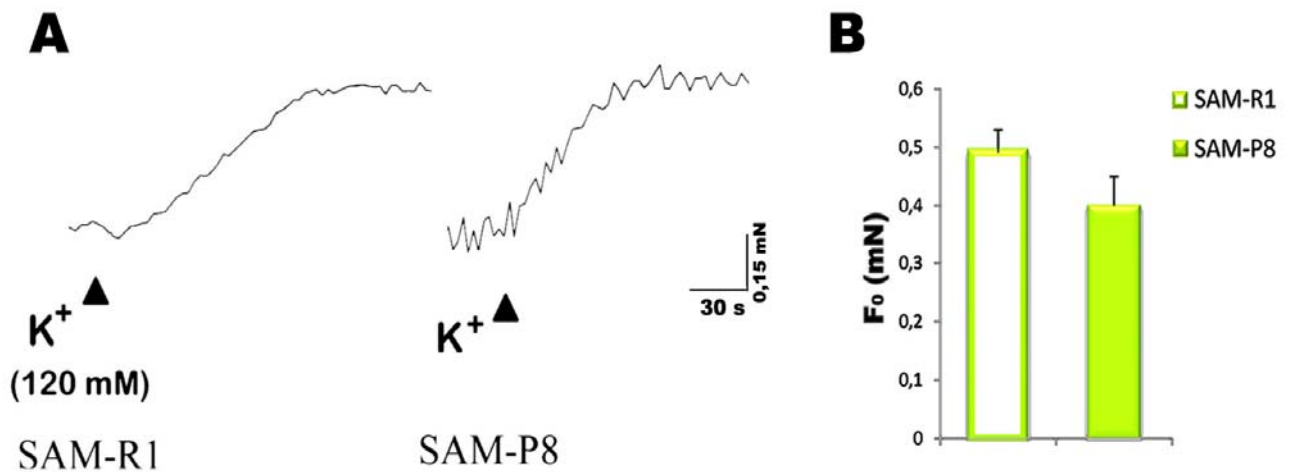


Figura 149. Registros representativos (A) y valores medios (B) de la respuesta contráctil inducida por K^+ (120 mM) en preparaciones longitudinales de músculo liso de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8. Los valores medios están expresados como media \pm error estándar de la media ($n=18$).

4.4.3. Diferencias en la contractilidad del cuerpo cavernoso inducida por EFS y por agonistas exógenos

4.4.3.1. Contracción

4.4.3.1.1. Respuesta contráctil inducida por EFS

a) Diferencias entre SAM-R1 y SAM-P8

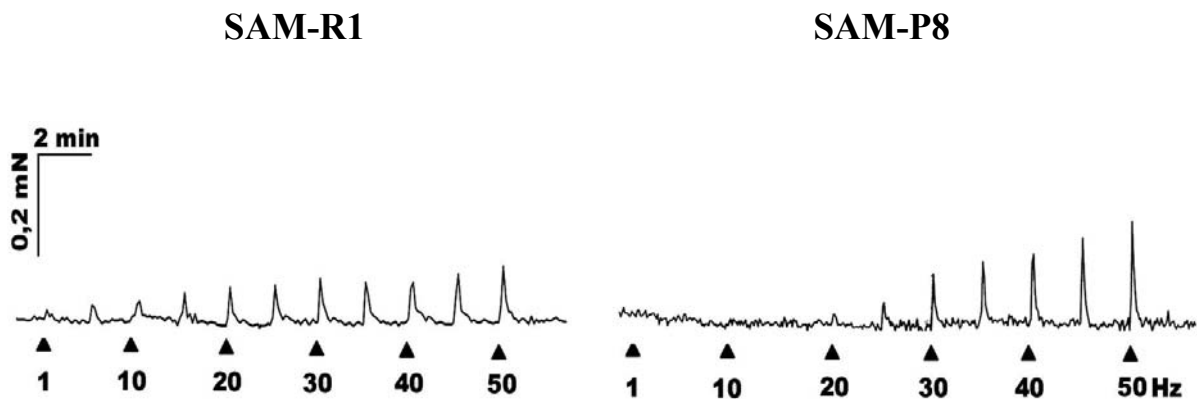


Figura 150. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso SAM-R1 y SAM-P8.

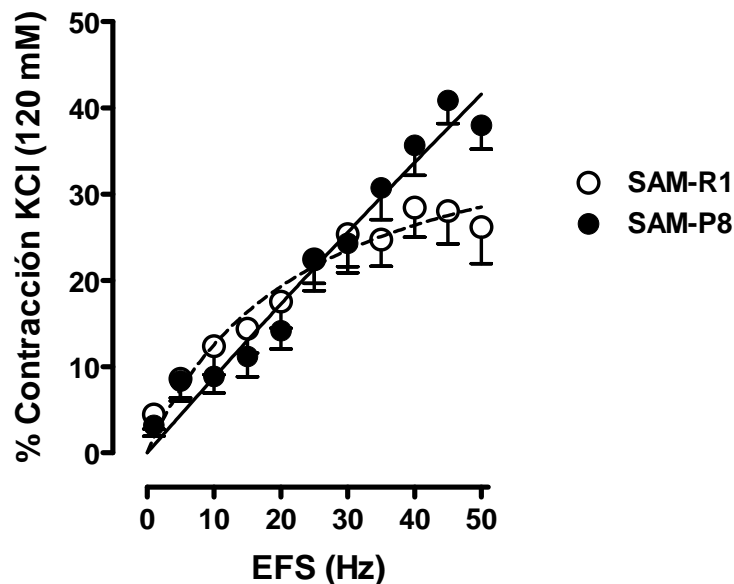


Figura 151. Curva frecuencia-respuesta inducida por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 9-11$).

b) Mediadores implicados

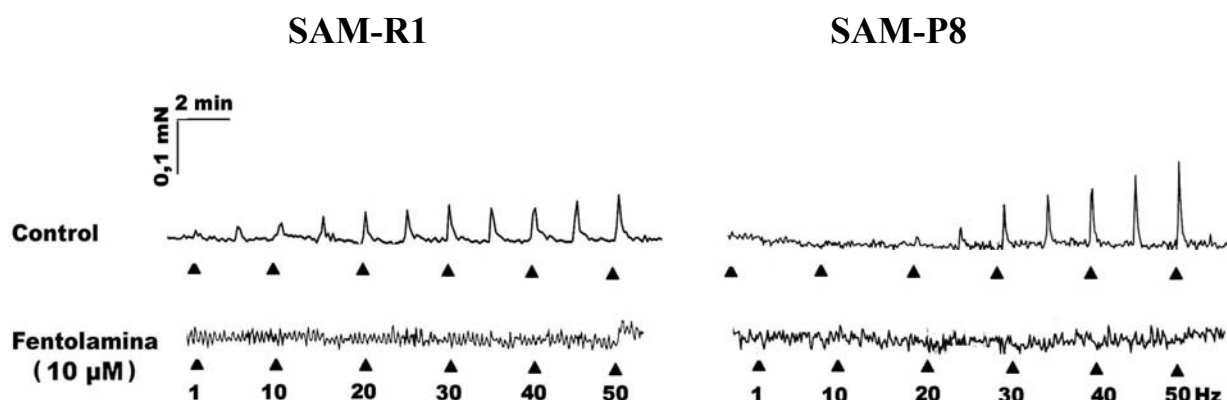


Figura 152. Registros representativos que muestran el efecto de la Fentolamina (10 µM) en la respuesta contráctil inducida por EFS (1-50 Hz) en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso.

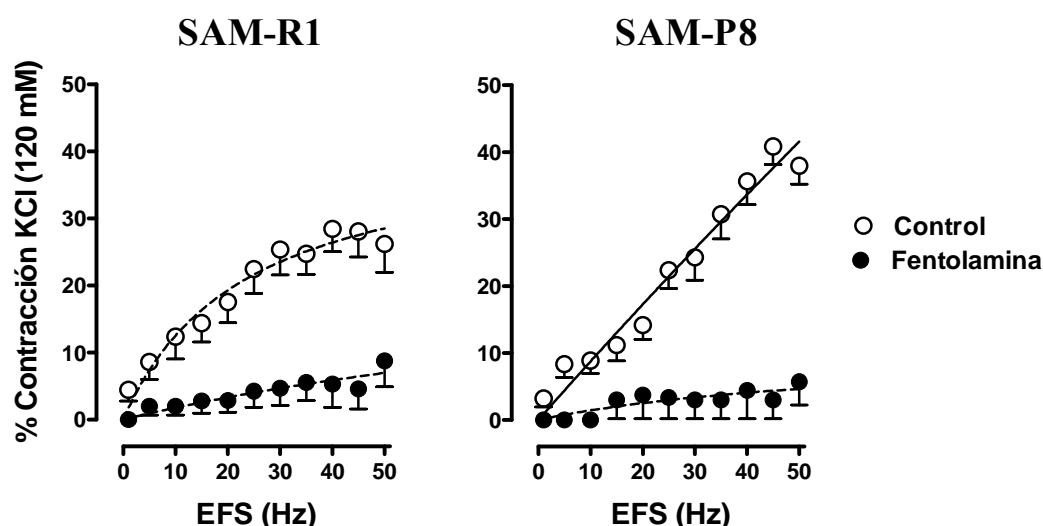


Figura 153. Curvas frecuencia-respuesta que muestran el efecto de la preincubación (30 min) con Fentolamina (10 µM) sobre la contracción inducida por EFS (1-50 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 6-11$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	EF ₅₀	E _{max}	<i>n</i>	EF ₅₀	E _{max}	<i>n</i>
Control	15,9 \pm 3,8	28,1 \pm 3,8 (45 Hz)	9	27,1 \pm 1,6 **	40,9 \pm 2,7 * (45 Hz)	11
Fentolamina (10 µM)	12 \pm 4,1	8,8 \pm 3,6 [#] (50 Hz)	7	1,5 \pm 0,5 ^{###}	7,1 \pm 4,5 ^{###} (50 Hz)	6

Tabla 14. Valores de potencia (EF₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación frecuencia-respuesta en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 en condiciones control y en presencia de Fentolamina (10 µM). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n = 6-11$). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y [#] $p < 0,05$ y ^{###} $p < 0,001$ respecto a la respuesta control.

4.4.3.1.2. Respuesta contráctil inducida por NA

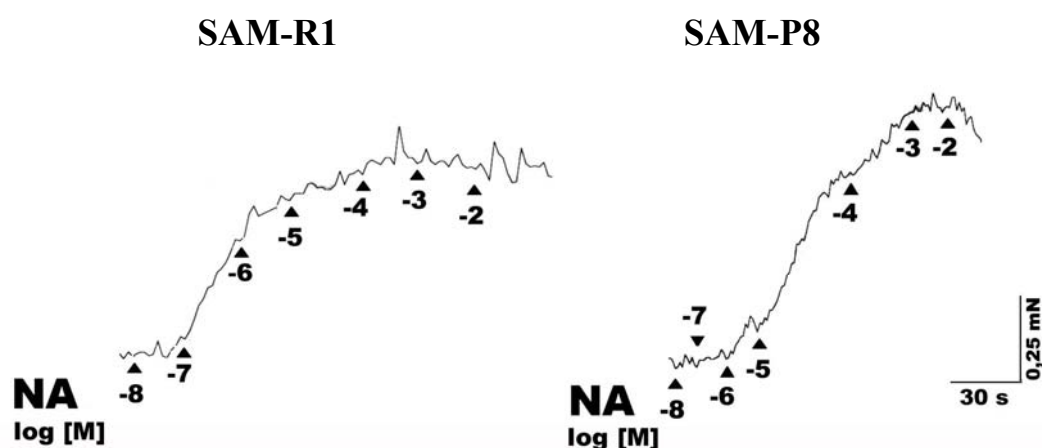


Figura 154. Registro representativo de la respuesta contráctil inducida por la adición acumulativa (10^{-8} a 10^{-2} M) de NA exógena en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8. Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

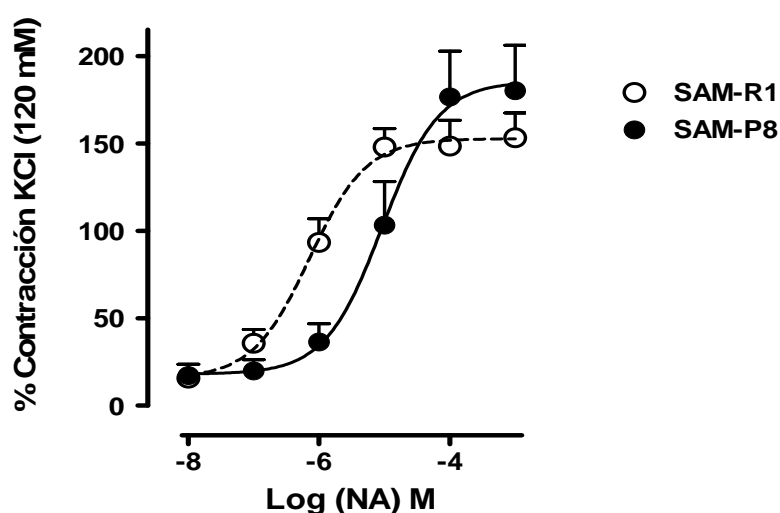


Figura 155. Curva dosis-respuesta (10^{-8} M a 10^{-2} M) inducida por NA en preparaciones de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8. Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=11-13$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n
NA	6,0 \pm 0,1	153,2 \pm 14,3	11	4,8 \pm 0,4 *	180,1 \pm 26,1	13

Tabla 15. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta inducida por NA (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 y expresados como media \pm error estándar de la media ($n=11-13$). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

4.4.3.2. Relajación

4.4.3.2.1. Respuesta relajante inducida por EFS

a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8

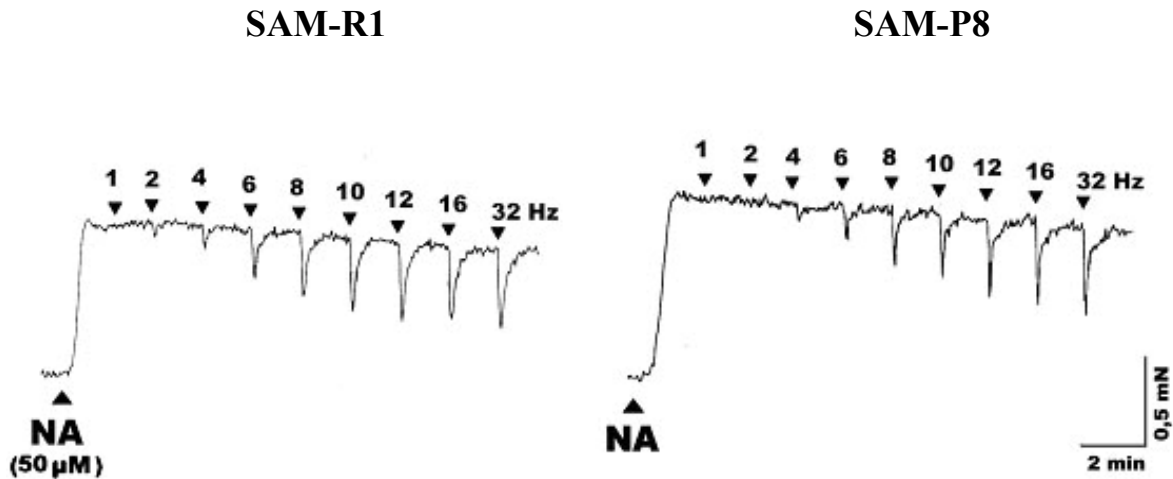


Figura 156. Registro representativo de la respuesta relajante inducida por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M).

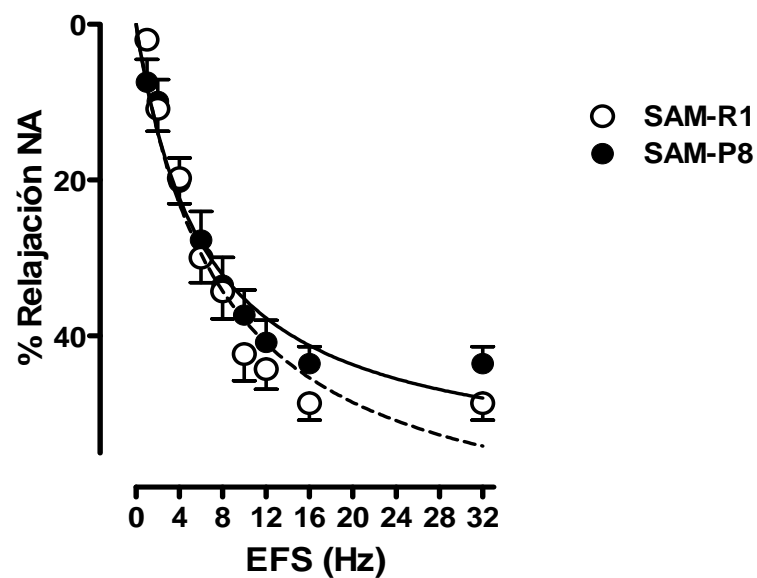


Figura 157. Curva frecuencia-respuesta inducida por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 10-12$).

b) Mediadores implicados

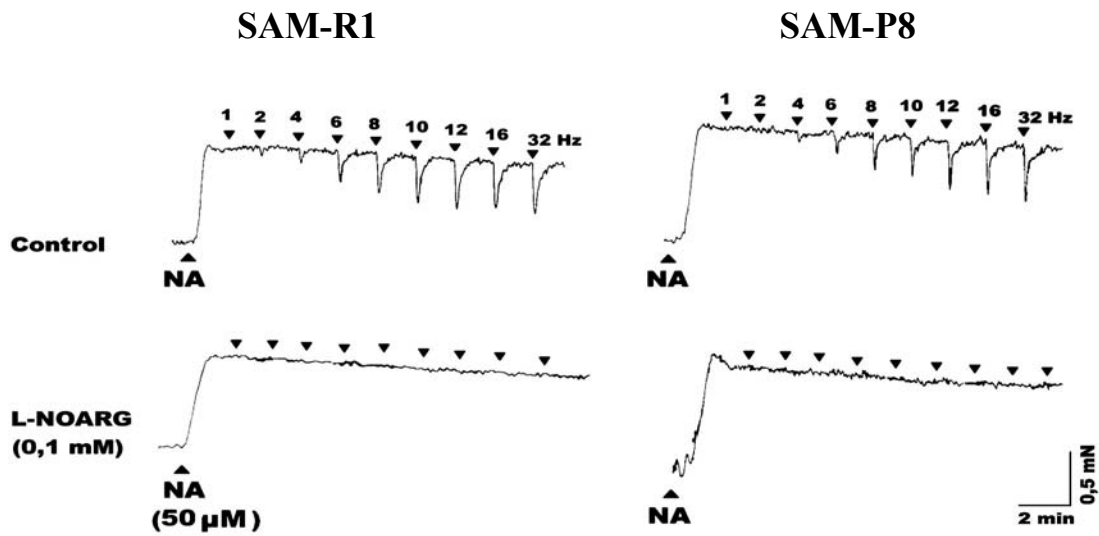


Figura 158. Registro representativo del efecto de la inhibición de NOS con L-NOARG (0,1 mM; 30 min) sobre la respuesta relajante inducida por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M).

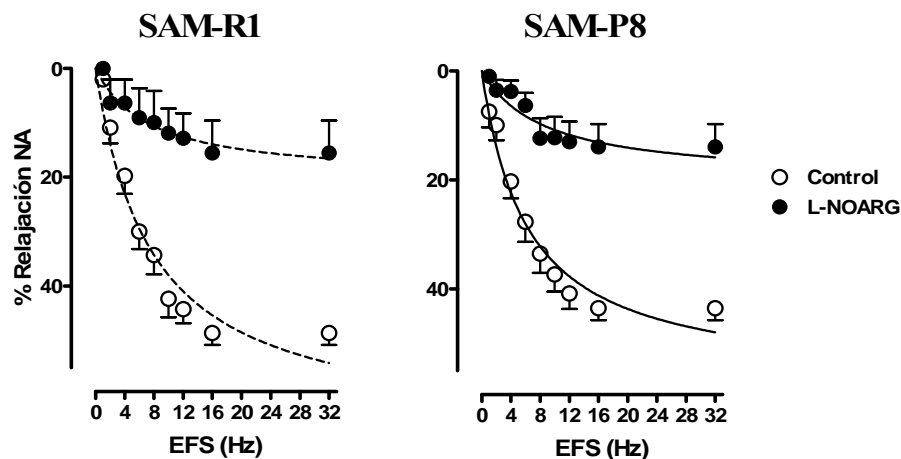


Figura 159. Curvas frecuencia-respuesta inducidas por EFS (1-32 Hz) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) y efecto del pretratamiento con L-NOARG (0,1 mM). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 6-12$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	EF ₅₀	E _{max} (16 Hz)	n	EF ₅₀	E _{max} (16 Hz)	n
Control	5,3 \pm 0,5	49,2 \pm 2,6	10	5 \pm 0,4	43,9 \pm 2,9	12
L-NOARG (0,1 mM)	4 \pm 1,4	15,6 \pm 5,9 ^{###}	6	4 \pm 1,3	13,9 \pm 4,3 ^{##}	6

Tabla 16. Valores de potencia (EF₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación frecuencia-respuesta en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) en condiciones control y en presencia de L-NOARG (0,1 mM). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n = 6-12$). ^{##}p<0,01 y ^{###}p<0,001 señala diferencias significativas respecto a la respuesta control.

4.4.3.2.2. Respuesta relajante inducida por DEA/NO

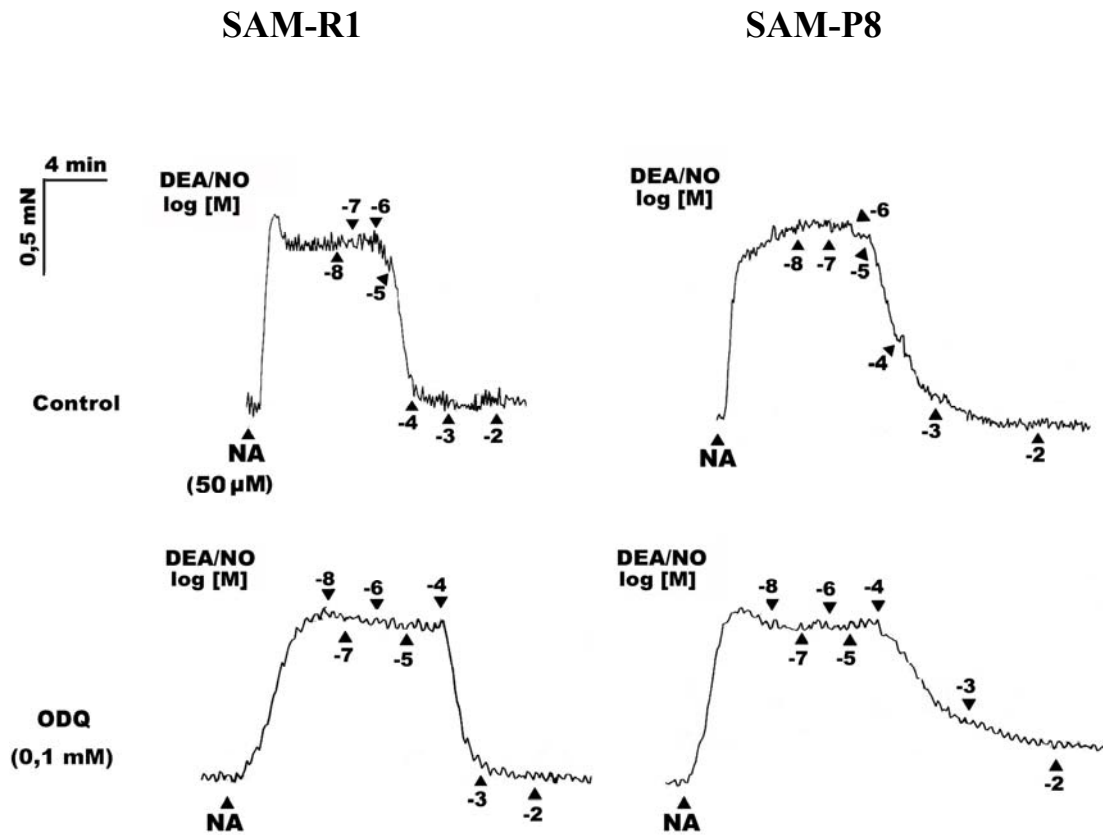


Figura 160. Registro representativo mostrando la respuesta relajante inducida por la adición de DEA/NO (10^{-8} a 10^{-2} M) en forma acumulativa y el efecto del antagonista de la guanilato ciclasa ODQ (0,1 mM) en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

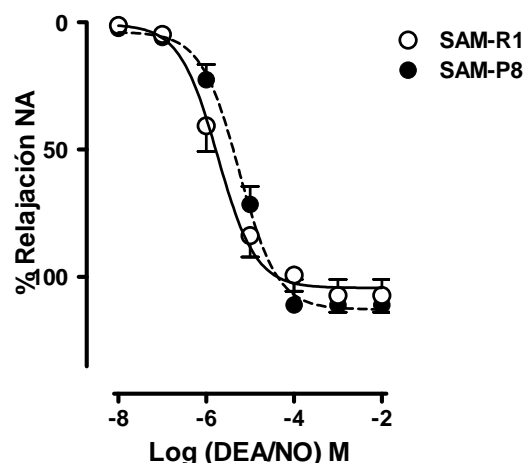


Figura 161. Curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de DEA/NO (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA ($50 \mu\text{M}$). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=8-10$).

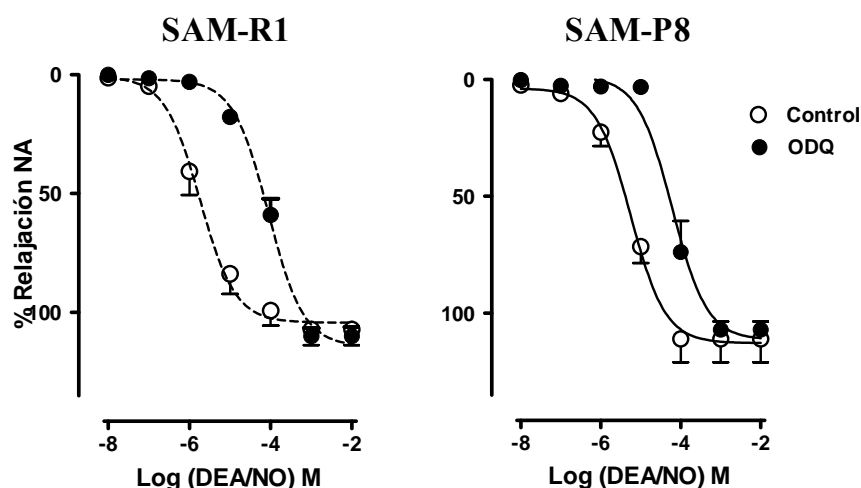


Figura 162. Curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de DEA/NO (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA ($50 \mu\text{M}$) y el efecto del tratamiento con ODQ ($0,1 \text{ mM}$). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=4-10$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n
DEA/NO	$5,7 \pm 0,2$	$107,2 \pm 6,6$	8	$5,3 \pm 0,1^*$	$111,0 \pm 10,1$	10
DEA/NO + ODQ ($0,1 \text{ mM}$)	$4,3 \pm 0,3^{###}$	$110,0 \pm 3,8$	4	$4,3 \pm 0,1^{###}$	$107,0 \pm 3,5$	4

Tabla 17. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta inducida por DEA/NO (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA ($50 \mu\text{M}$), en condiciones control y en presencia de ODQ ($0,1 \text{ mM}$). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n=4-10$). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y $^{###}p<0,001$ respecto a la respuesta control.

4.4.3.2.3. Respuesta relajante inducida por Sildenafil

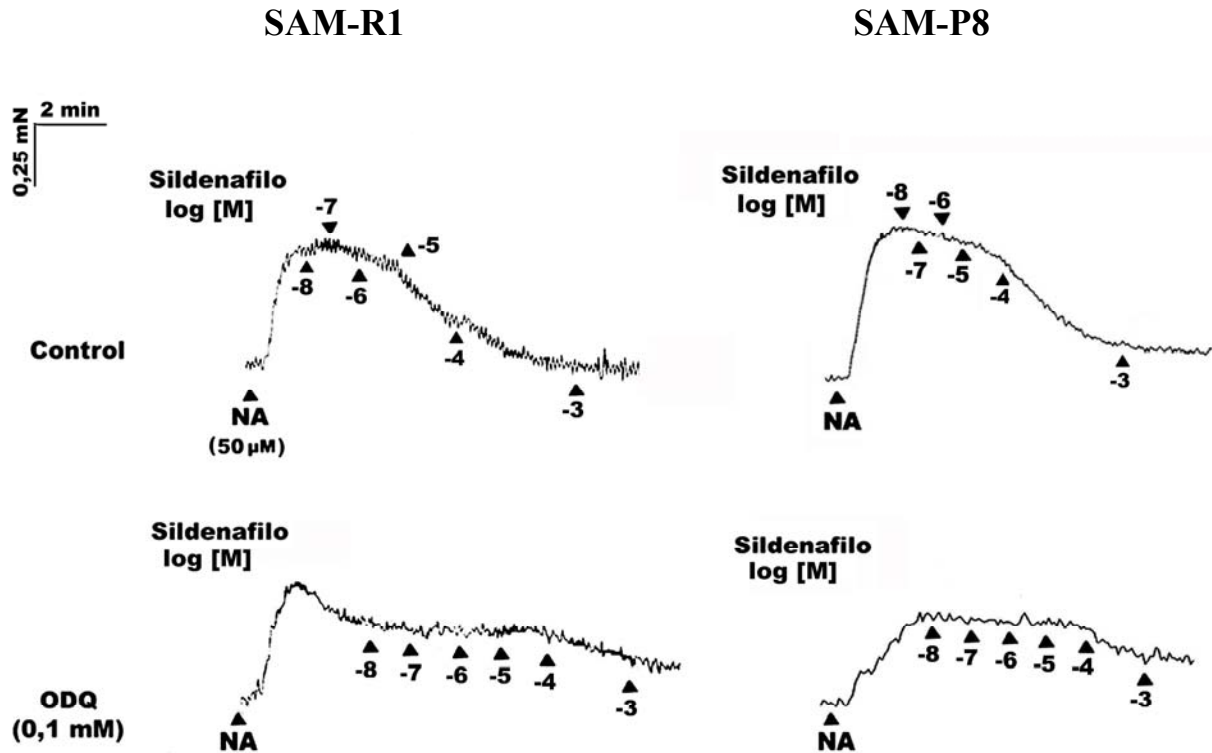


Figura 163. Registro representativo mostrando la respuesta relajante inducida por la adición de Sildenafil (10^{-8} a 10^{-3} M) en forma acumulativa y el efecto del antagonista de la guanilato ciclasa ODQ (0,1 mM) en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración aplicada (log [M]).

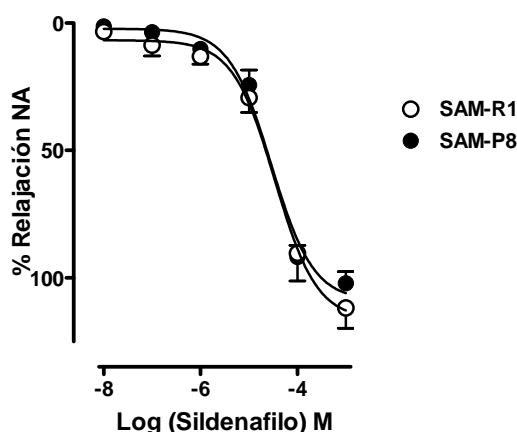


Figura 164. Curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de Sildenafil (10^{-8} M a 10^{-3} M) en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=9-12$).

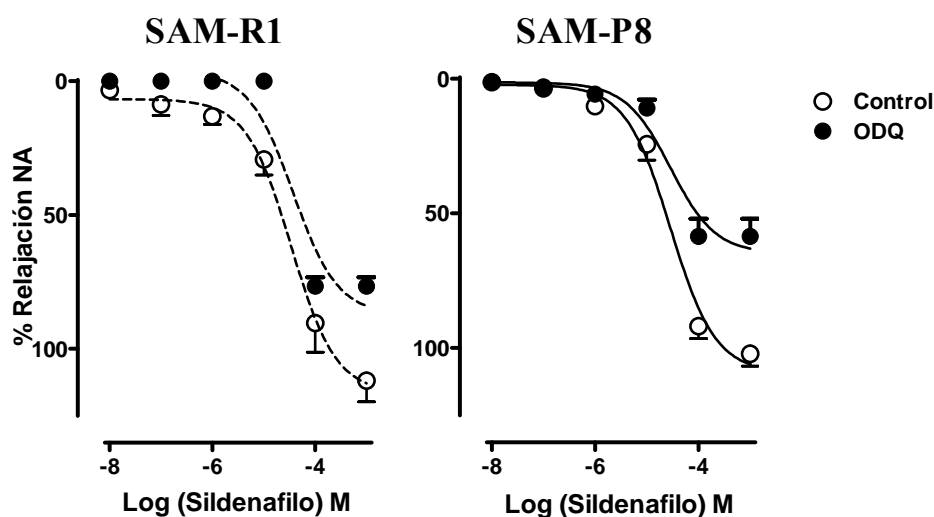


Figura 165. Efecto del ODQ (0,1 mM; 30 min) sobre las curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de Sildenafil (10^{-8} M a 10^{-3} M) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=6-12$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-3} M)	n
Sildenafil	4,5 \pm 0,1	111,9 \pm 7,9	9	4,4 \pm 0,3	102,2 \pm 4,5	12
Sildenafil + ODQ (0,1 mM)	4,7 \pm 0,1	76,7 \pm 3,4 ^{##}	6	4,6 \pm 0,5	58,6 \pm 6,6 ^{##}	6

Tabla 18. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta inducida por Sildenafil (10^{-8} M a 10^{-3} M) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M), en condiciones control y en presencia de ODQ (0,1 mM). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n=6-12$). ^{##}p<0,01 señala diferencias significativas respecto a la respuesta control.

4.4.3.2.4. Respuesta relajante de larga duración inducida por EFS y por DEA/NO exógeno y el efecto de IBMX y zaprinast

a) Diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8

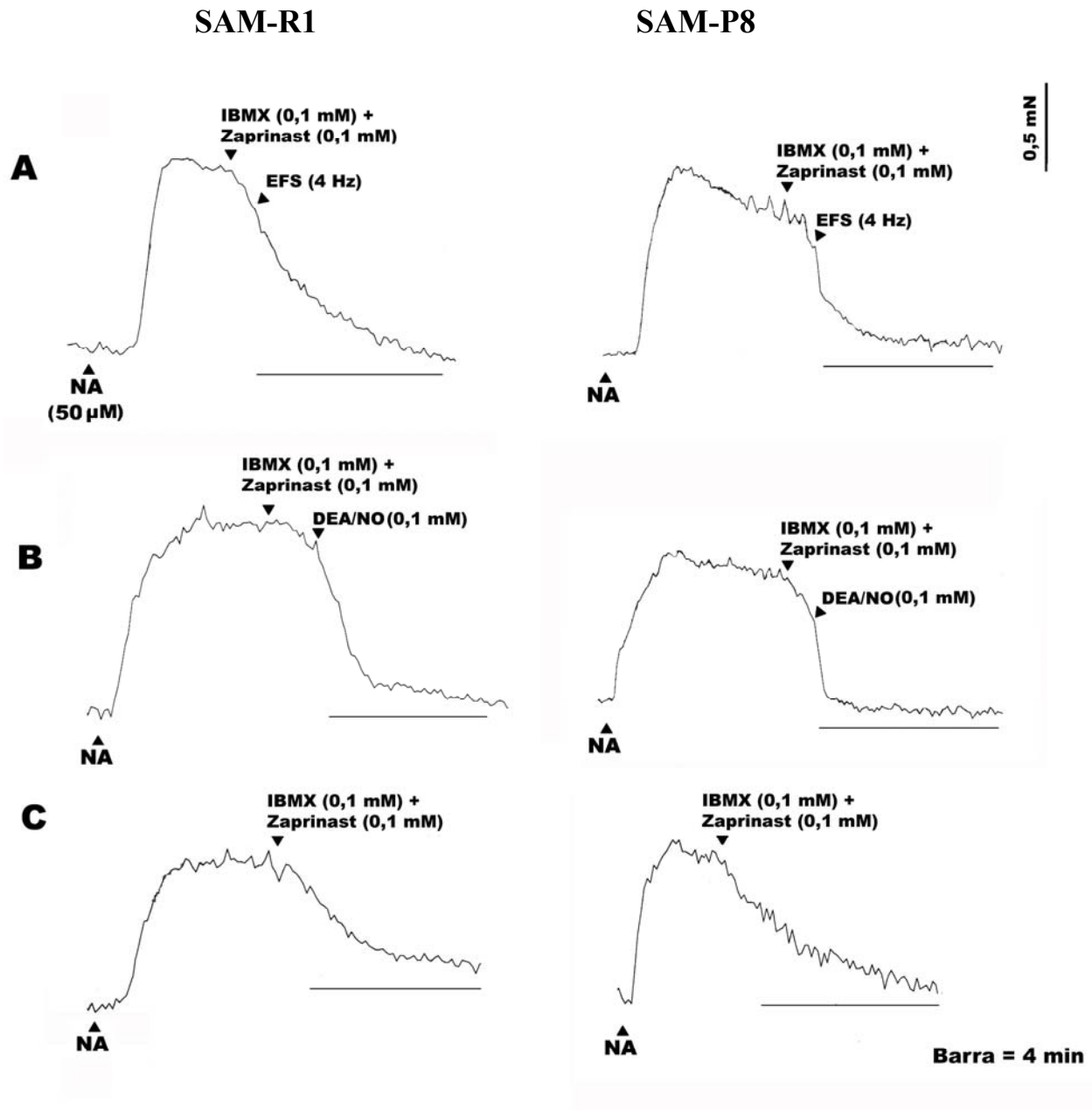


Figura 166. Registros representativos de las respuestas relajantes inducidas por estimulación durante 4 minutos con EFS (4 Hz) (**A**) o DEA/NO (0,1 mM) (**B**) en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) y en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM; 30 s antes). En **C** se muestra la relajación inducida por la adición exclusiva de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) durante 4 minutos.

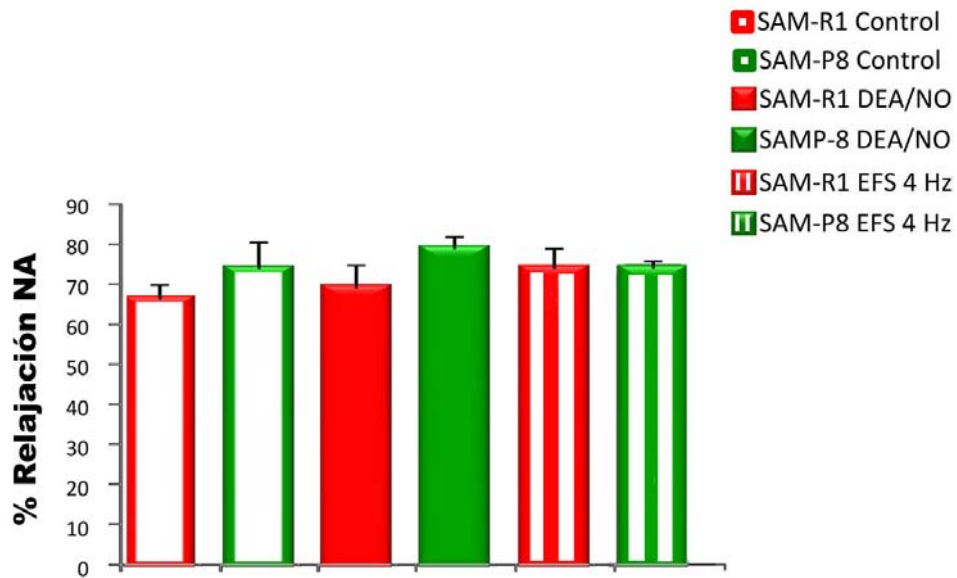


Figura 167. Valores medios de la relajación inducida por DEA/NO (0,1 mM) y EFS (4 Hz) durante 4 minutos en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) y en presencia de IBMX (0,01 mM) y Zaprinast (0,01 mM). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan en porcentaje del nivel de contracción previa inducido por NA y se dan como media \pm error estándar de la media ($n=5-6$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

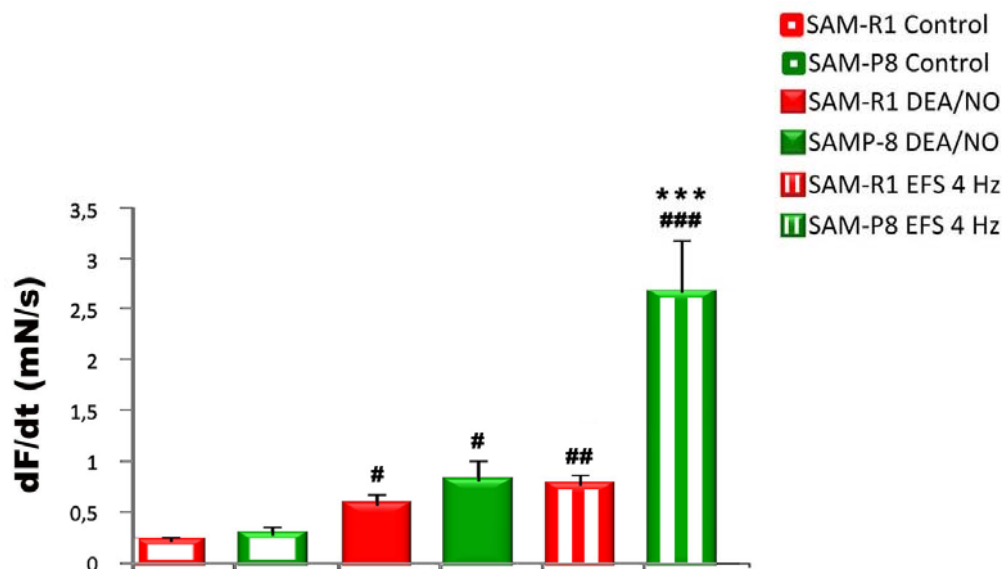


Figura 168. Pendiente (dF/dt) de las relajaciones inducidas durante 4 minutos por DEA/NO (0,1 mM) y EFS (4 Hz) en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) y en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 5-6$). *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ respecto al control.

b) Efecto de la inhibición de GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)

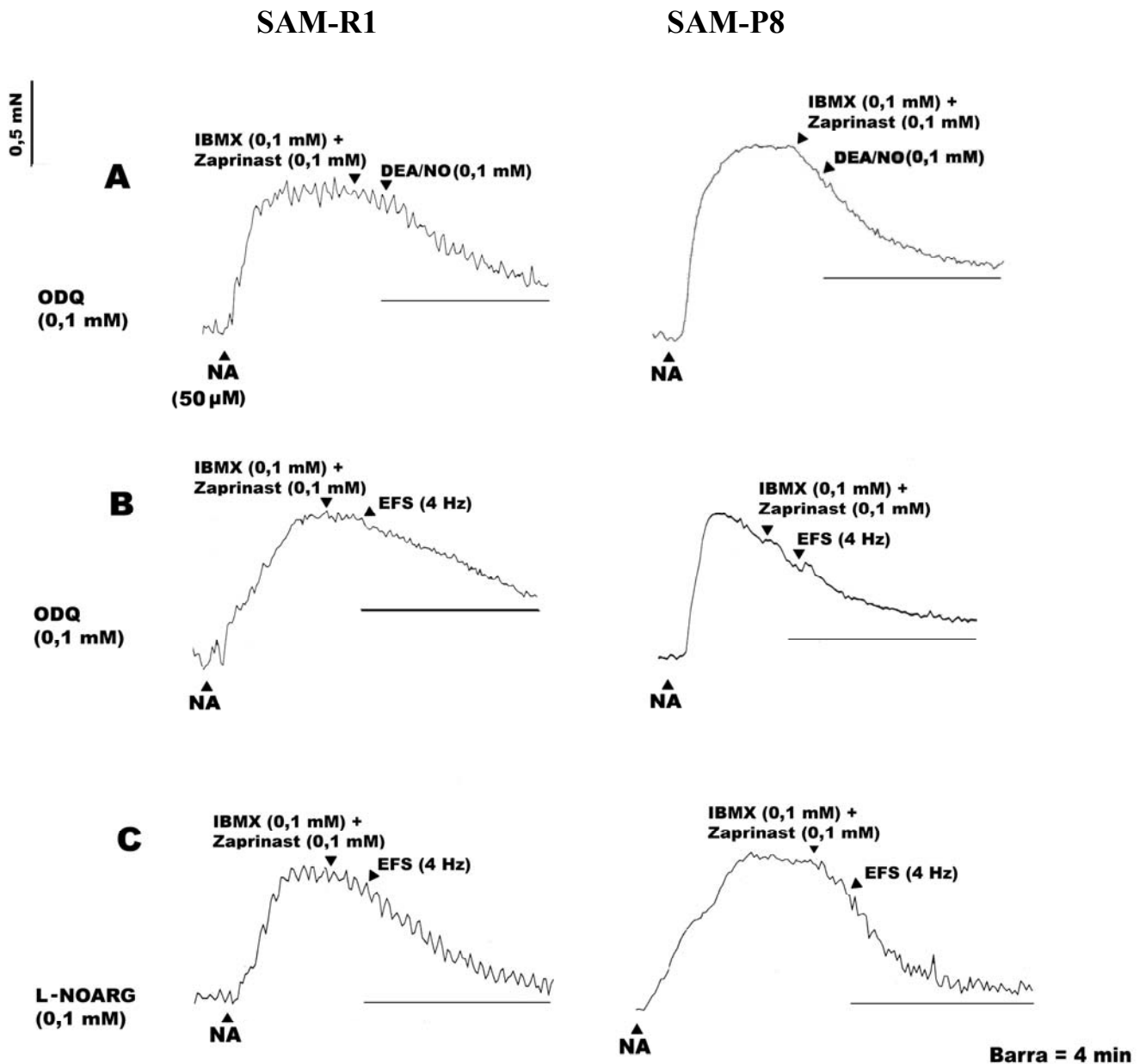


Figura 169. Registros representativos del efecto del pretratamiento con ODQ (0,1 mM; 30 min) o L-NOARG (0,1 mM; 30 min) sobre las respuestas relajantes inducidas por estimulación continua durante 4 minutos con DEA/NO (0,1 mM) (A) o EFS (4 Hz) (B y C) en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) y en presencia de IBMX y Zaprinast (0,1 mM; 30 s antes).

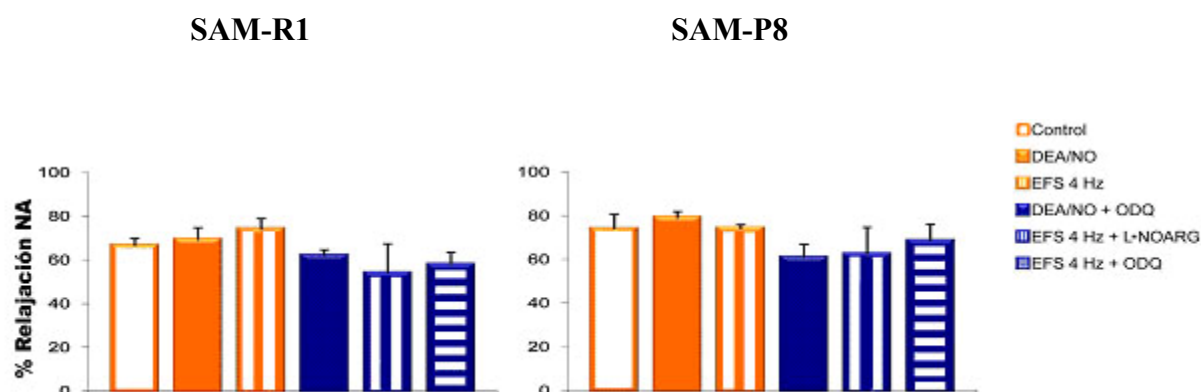


Figura 170. Valores medios de la relajación alcanzada a los 4 minutos por DEA/NO (0,1 mM) o EFS (4Hz) en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) en presencia de IBMX y Zaprinast (0,1 mM; 30 s antes) y pretratados con ODQ o L-NOARG (0,1 mM; 30 min). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por la adición sólo de IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan en porcentaje del nivel de precontracción con NA y como media \pm error estándar de la media ($n = 4$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA).

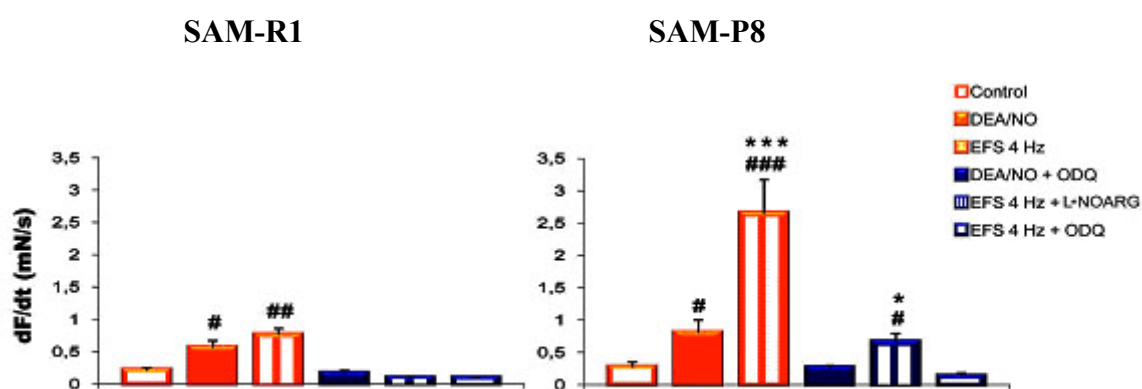


Figura 171. Pendiente (dF/dt) de las relajaciones inducidas durante 4 minutos por DEA/NO (0,1 mM) y EFS (4 Hz) en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) en presencia de IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM) y pretratados con ODQ o L-NOARG (0,1 mM; 30 min). Los valores control representan la relajación inducida durante 4 minutos por la adición sólo de IBMX y Zaprinast. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($n = 4$). * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1, y [#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ y ^{###} $p < 0,001$ respecto al control.

4.4.4. Diferencias en la funcionalidad endotelial del cuerpo cavernoso

4.4.4.1. Respuesta relajante/contráctil inducida por ACh

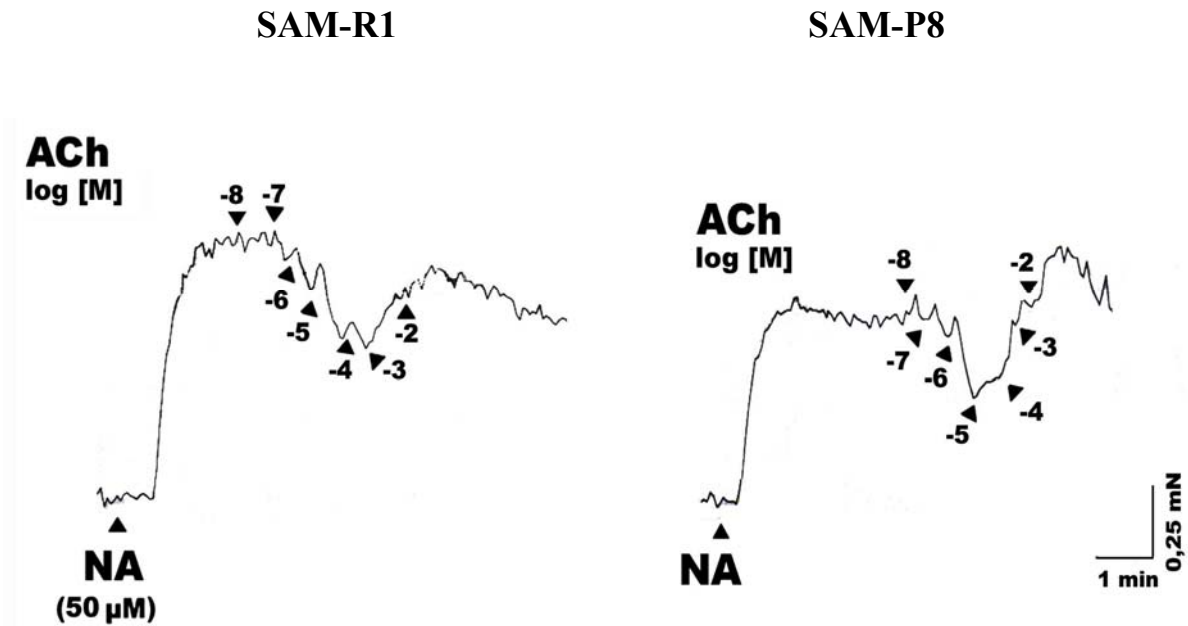


Figura 172. Registro representativo mostrando la respuesta relajante (a bajas concentraciones) y contráctil (a altas concentraciones) inducidas por la adición de ACh exógena (10^{-8} a 10^{-2} M) en forma acumulativa en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA ($50 \mu\text{M}$). Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar ($\log [M]$).

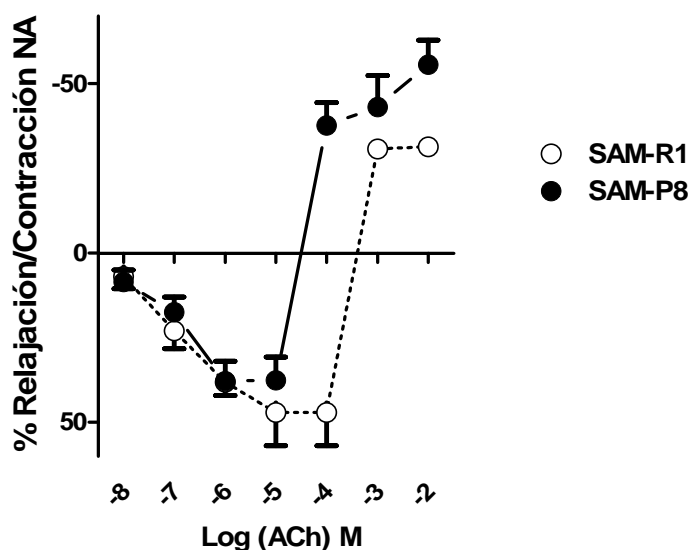


Figura 173. Curvas dosis-respuesta inducidas por la adición exógena de ACh (10^{-8} M a 10^{-2} M) en preparaciones de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n=7$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-5} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-5} M)	n
ACh	6,9 \pm 0,2	47,1 \pm 9,8	7	7,3 \pm 0,2	37,6 \pm 6,8	7

Tabla 19. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta relajante inducida por ACh (10^{-8} M a 10^{-4} M) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n=7$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10^{-2} M)	n
ACh	3,1 \pm 0,1	31,3 \pm 0,5	7	4,1 \pm 0,2*	55,7 \pm 7,1*	7

Tabla 20. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta contráctil inducida por ACh (10^{-4} M a 10^{-2} M) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Los datos representan la media \pm error estándar de la media ($n=7$). *p<0,05 señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

4.4.4.4.2. Mediadores implicados

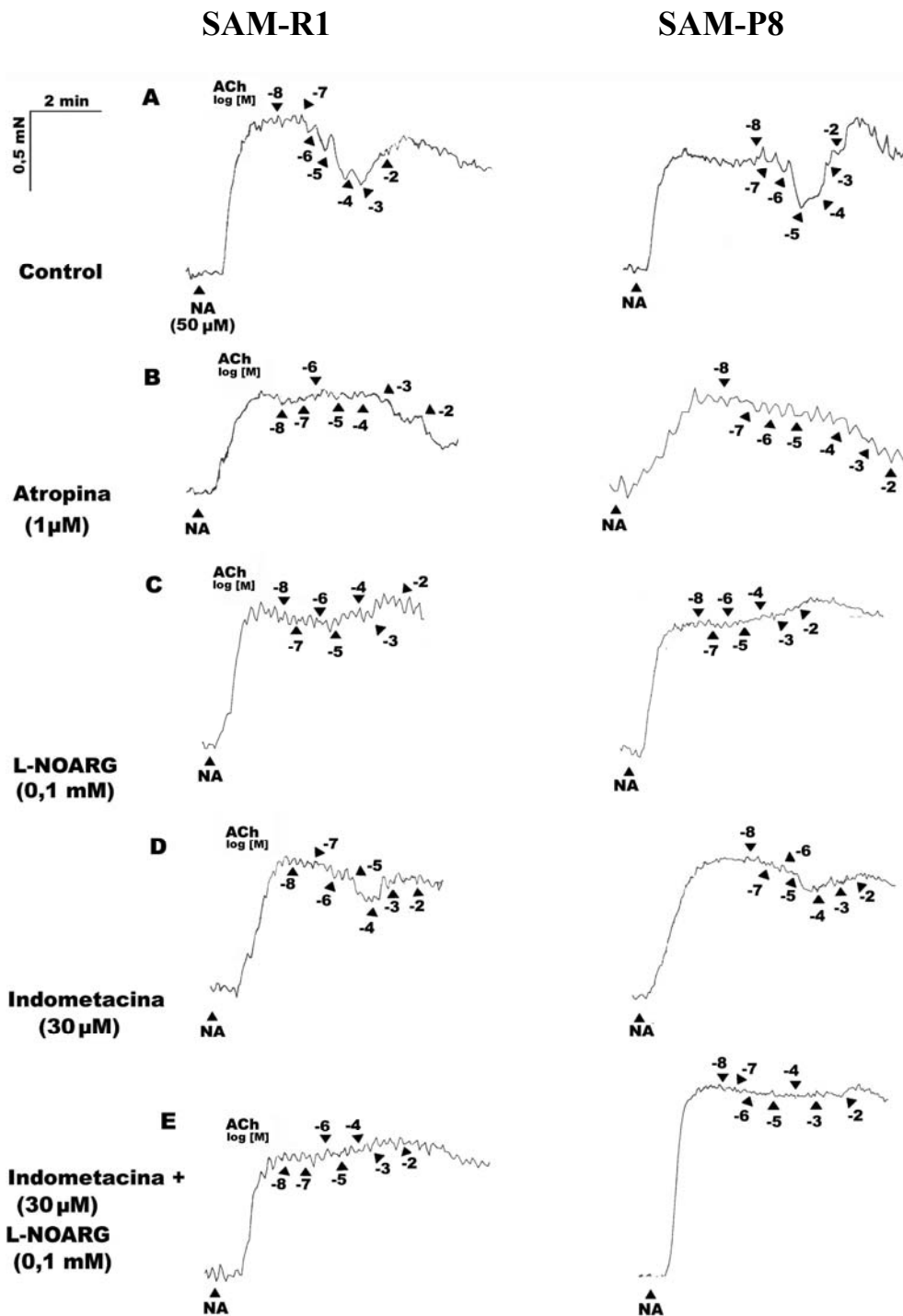


Figura 174. Registros representativos del efecto del pretratamiento con Atropina (1 μ M, 30 min), L-NOARG (0,1 mM; 30 min), Indometacina (30 μ M, 30 min) o L-NOARG + Indometacina (30 min) sobre las respuestas relajantes y contráctiles inducidas por la adición de ACh exógena (10^{-8} a 10^{-2} M) en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M). Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración molar (log [M]).

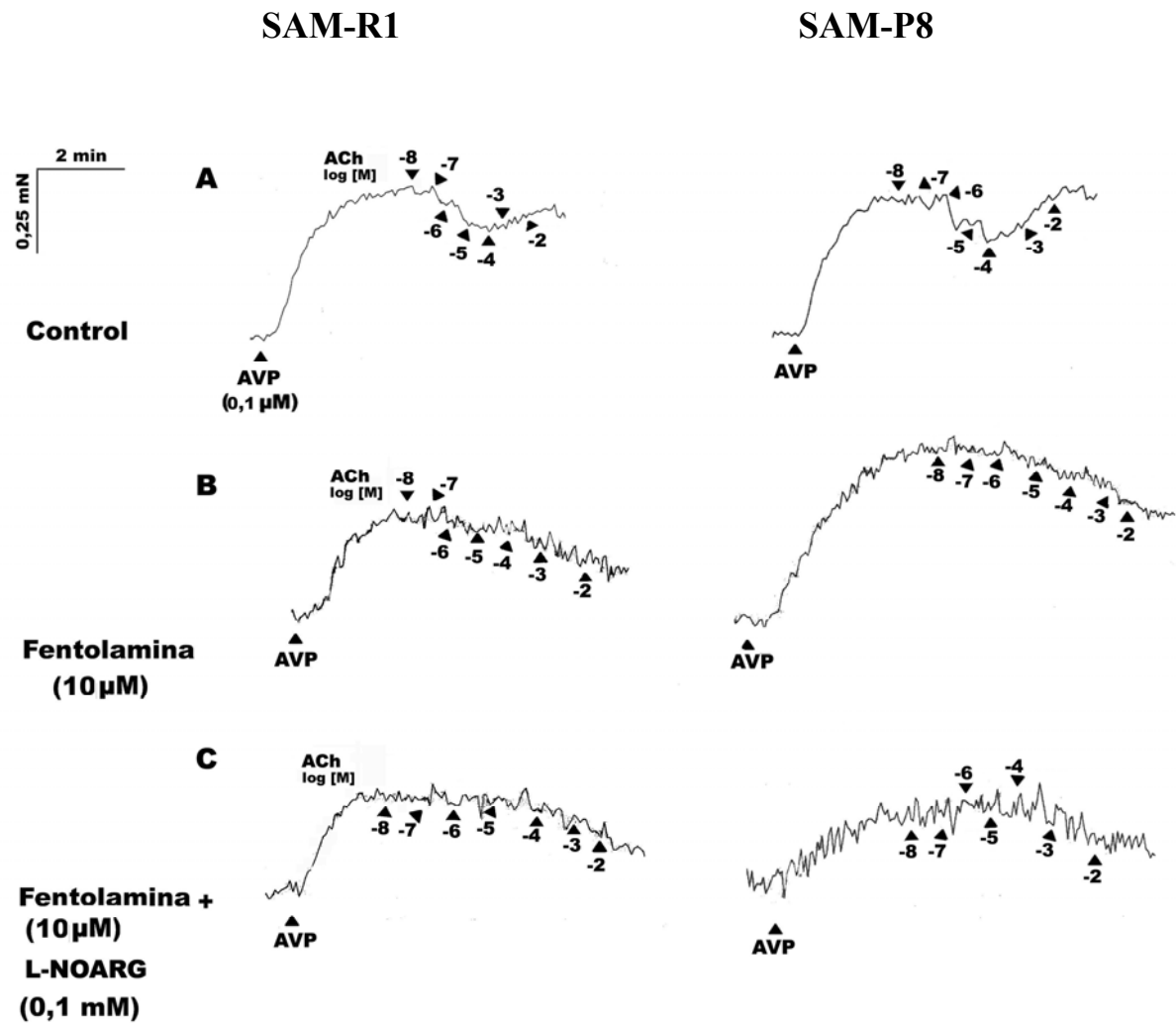


Figura 175. Registros representativos del efecto del pretratamiento con Fentolamina (10 μM, 30 min), o Fentolamina + L-NOARG (10 μM y 0,1 mM respectivamente, 30 min) sobre las respuestas relajantes y contráctiles inducidas por la adición de ACh exógena (10^{-8} a 10^{-2} M) en forma acumulativa en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con AVP (0,1 μM). Las concentraciones se expresan como el logaritmo de la concentración aplicada molar (log [M]).

a) Respuesta relajante

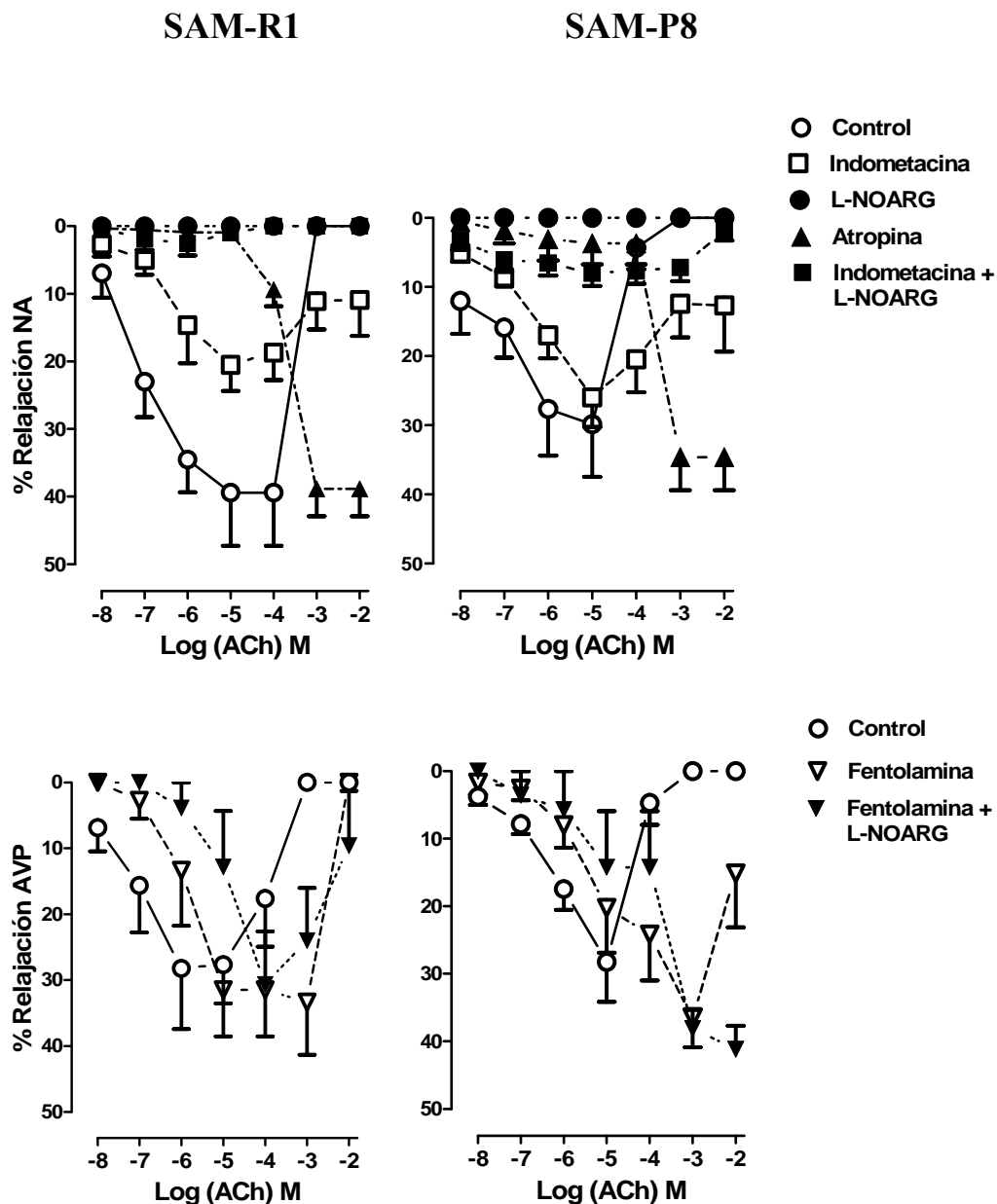


Figura 176. Curvas dosis-respuesta que muestran el efecto de la preincubación (30 min) con Atropina (1 μ M), L-NOARG (0,01 mM), Indometacina (30 μ M), Indometacina + L-NOARG, Fentolamina (10 μ M) y Fentolamina + L-NOARG sobre la respuesta relajante inducida por la adición de ACh exógena (10^{-8} a 10^{-2} M) en forma acumulativa en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) o AVP (0,1 μ M). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 4-12$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max}	n	pEC ₅₀	E _{max}	n
Control (NA)	7,0 ± 0,1	39,4 ± 7,8 (10 ⁻⁵ M)	6	6,9 ± 0,2	29,9 ± 7,6 (10 ⁻⁵ M)	11
Atropina (1 µM)	3,6 ± 0,1 ^{###}	38,6 ± 4,0 (10 ⁻³ M)	9	3,3 ± 0,3 ^{###}	34,6 ± 4,8 (10 ⁻³ M)	7
L-NOARG (0,1 mM)	—	0,0 ± 0,0 ^{##}	6	—	0,0 ± 0,0 ^{##}	11
Indometacina (30 µM)	6,1 ± 0,2 ^{##}	20,5 ± 3,9 (10 ⁻⁵ M)	8	5,9 ± 0,3 [#]	25,9 ± 4,3 (10 ⁻⁵ M)	12
Indometacina (30 µM)+ L-NOARG (0,1 mM)	6,8 ± 1,0	2,6 ± 1,8 ^{##} (10 ⁻⁶ M)	9	6,9 ± 0,4	8,0 ± 1,8 ^{###} (10 ⁻⁵ M)	12
Control (AVP)	7,0 ± 0,3	28,2 ± 9,2 (10 ⁻⁵ M)	6	6,5 ± 0,2	28,2 ± 5,9 (10 ⁻⁵ M)	8
Fentolamina (10 µM)	5,7 ± 0,3 [#]	37,8 ± 6,6 (10 ⁻³ M)	4	5,1 ± 0,4 ^{##}	36,6 ± 4,3 (10 ⁻³ M)	5
Fentolamina (10 µM)+ L-NOARG (0,1 mM)	5,0 ± 0,6 [#]	33,3 ± 8,3 (10 ⁻⁴ M)	4	4,9 ± 1,1 [#]	41,6 ± 3,5 (10 ⁻² M)	4

Tabla 21. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta relajante inducida por ACh (10⁻⁸M a 10⁻²M) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 µM) o con AVP (0,1µM). Los datos representan la media ± error estándar de la media (n = 4-12). [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 y ^{###}p<0,001 señala diferencias significativas respecto a la respuesta control.

b) Respuesta contráctil

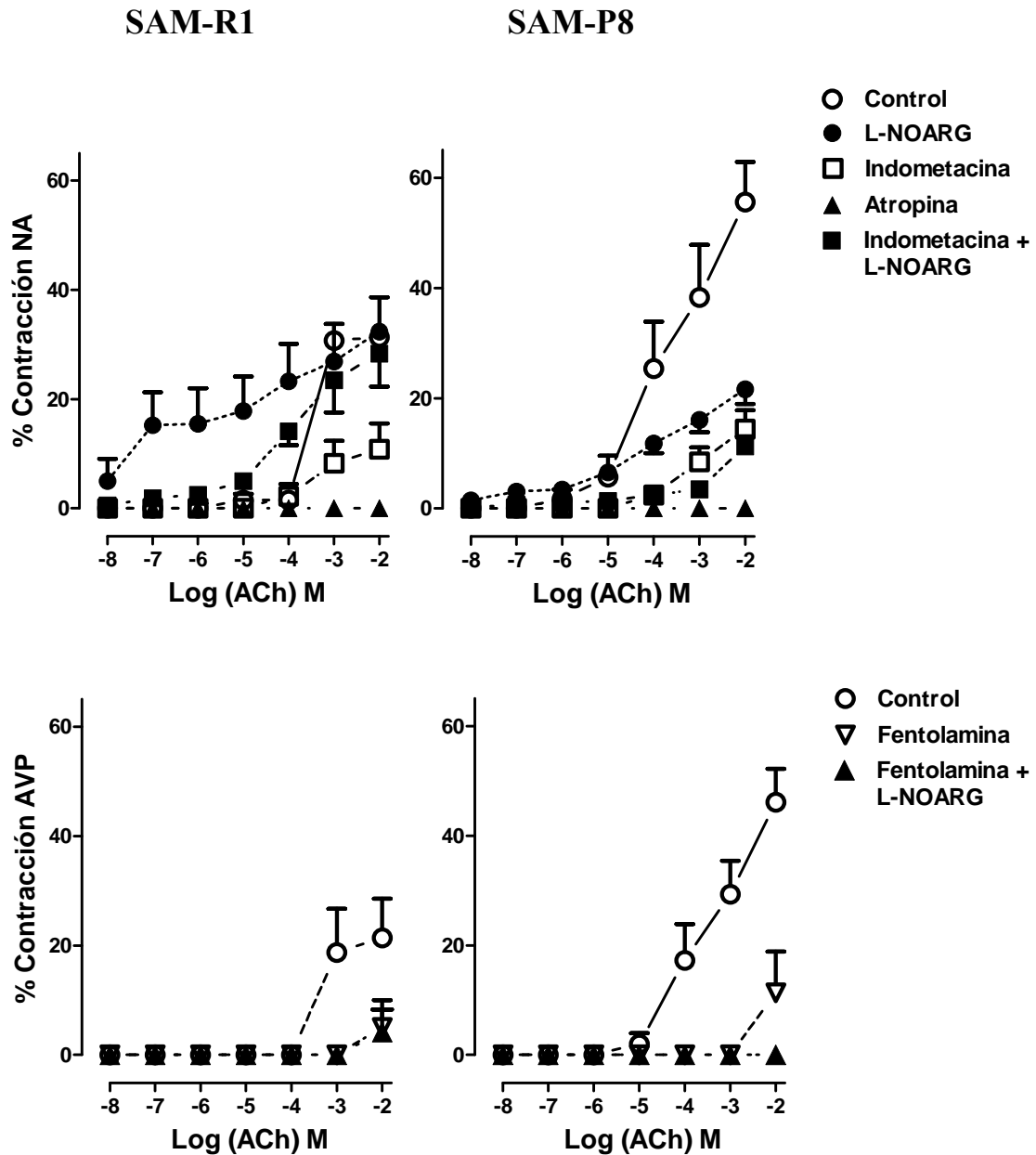


Figura 177. Curvas dosis-respuesta que muestran el efecto de la preincubación (30 min) con Atropina (1 μ M), L-NOARG (0,01 mM), Indometacina (30 μ M), Indometacina + L-NOARG, Fentolamina (10 μ M) y Fentolamina + L-NOARG sobre la respuesta contráctil inducida por la adición de ACh exógena (10^{-8} a 10^{-2} M) en forma acumulativa en tiras longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 μ M) o AVP (0,1 μ M). Los datos se han expresado como media \pm error estándar de la media ($n = 4-12$).

	SAM-R1			SAM-P8		
	pEC ₅₀	E _{max} (10 ⁻² M)	n	pEC ₅₀	E _{max} (10 ⁻² M)	n
Control (NA)	3,3 ± 0,1	31,3 ± 0,5	6	4,2 ± 0,2 **	55,6 ± 7,3 **	12
Atropina (1 µM)	—	0,0 ± 0,0 ###	9	—	0,0 ± 0,0 ###	7
L-NOARG (0,1 mM)	5,1 ± 0,2 ###	32,3 ± 6,3	6	4,0 ± 0,2 *	21,6 ± 2,6 ### *	11
Indometacina (30 µM)	3,3 ± 0,3	10,8 ± 4,7 ##	8	3,0 ± 0,2 ###	14,4 ± 3,4 ###	12
Indometacina (30 µM)+ L-NOARG (0,1 mM)	4,2 ± 0,3 #	28,3 ± 6,0	9	2,9 ± 0,2 ####	11,3 ± 1,7 ####	12
Control (AVP)	3,0 ± 0,2	21,4 ± 7,2	6	3,8 ± 0,1 **	46,1 ± 6,1 *	8
Fentolamina (10 µM)	2,0 ± 0,1 #	5,0 ± 5,0 #	4	2,0 ± 0,1 ###	11,3 ± 7,5 ##	6
Fentolamina (10 µM)+ L-NOARG (0,1 mM)	2,0 ± 0,1 #	4,2 ± 4,1 #	4	—	0,0 ± 0,0 ##	4

Tabla 22. Valores de potencia (pEC₅₀) y de respuesta máxima (E_{max}) de la relación dosis-respuesta contráctil inducida por ACh (10⁻⁸M a 10⁻²M) en preparaciones longitudinales de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8 precontraídas con NA (50 µM) o con AVP (0,1µM). Los datos representan la media ± error estándar de la media (n = 4-12). *p<0,05 y **p<0,01 señala diferencias significativas respecto a SAM-R1 y #p<0,05, ##p<0,01 y ###p<0,001 respecto a la respuesta control.

4.4.5. Cambios en la densidad de innervación en el cuerpo cavernoso

4.4.5.1. Innervación colinérgica

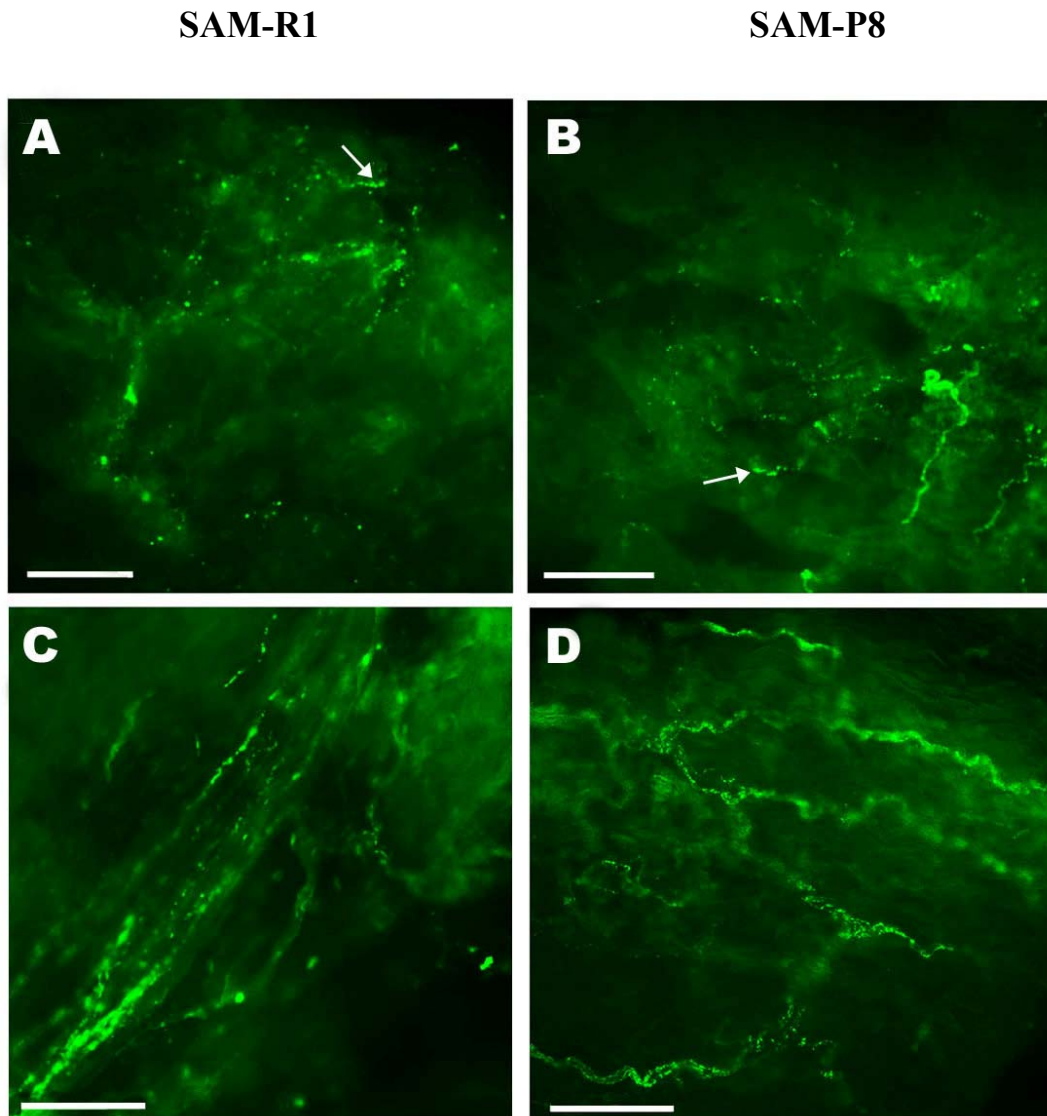


Figura 178. Inmunorreactividad a VAcHT en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8. **A** y **B**. Zona cavernosa donde se aprecian las varicosidades de las terminaciones nerviosas colinérgicas a pequeños aumentos. Las flechas señalan algunos puntos donde los nervios aparecen rodeando a los espacios lacunares. **C** y **D**. Zona de la túnica albugínea donde las fibras colinérgicas se disponen paralelas a las fibras musculares lisas. Se puede observar también innervación perivascular. Barra= 50 μ m.

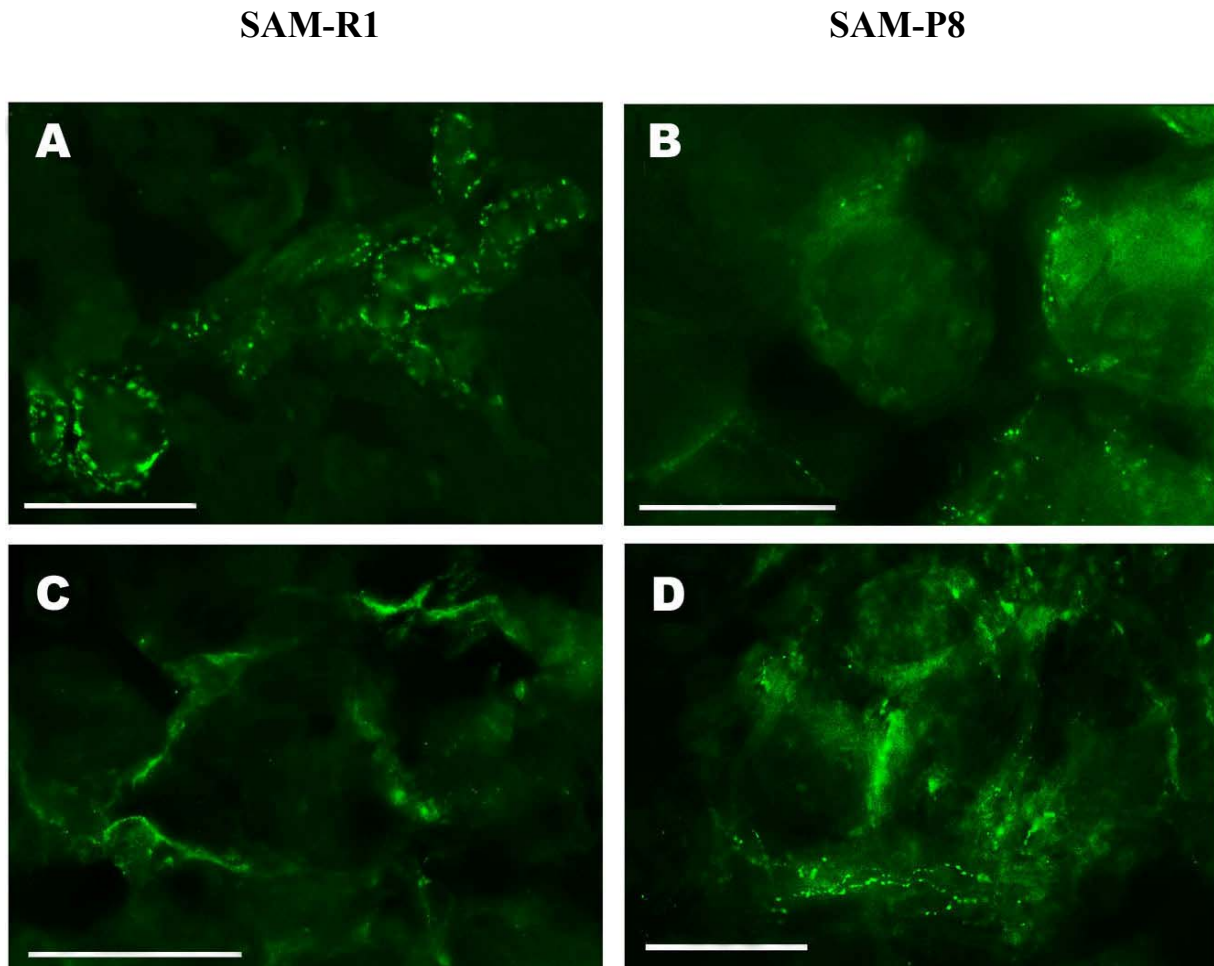


Figura 179. Detalles de estructuras inmunorreactivas a VACHT en cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8. En **A-D** se pueden apreciar las trabéculas de músculo liso de la zona cavernosa rodeadas por nervios colinérgicos. Barra = 50 μ m.

4.4.5.2 Inervación nitrérgica

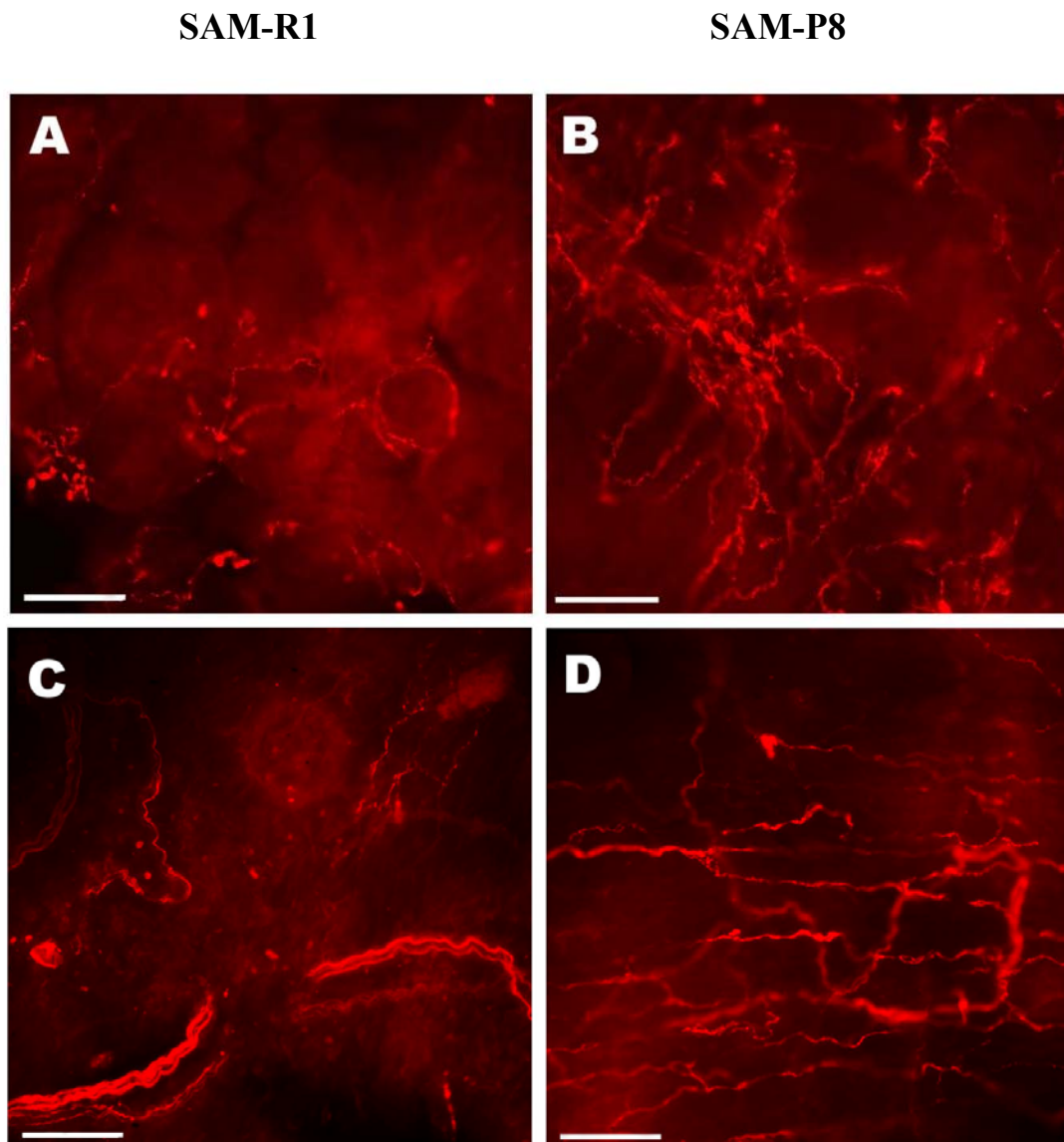


Figura 180. Inmunorreactividad a nNOS en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8. **A** y **B**. Inervación nitrérgica en la zona cavernosa. **C** y **D**. Troncos y terminaciones nerviosas finas en la zona de la túnica albugínea. En ambas zonas se observa un claro aumento de la inervación nitrérgica en SAM-P8 respecto a SAM-R1. Barra= 50 μ m.

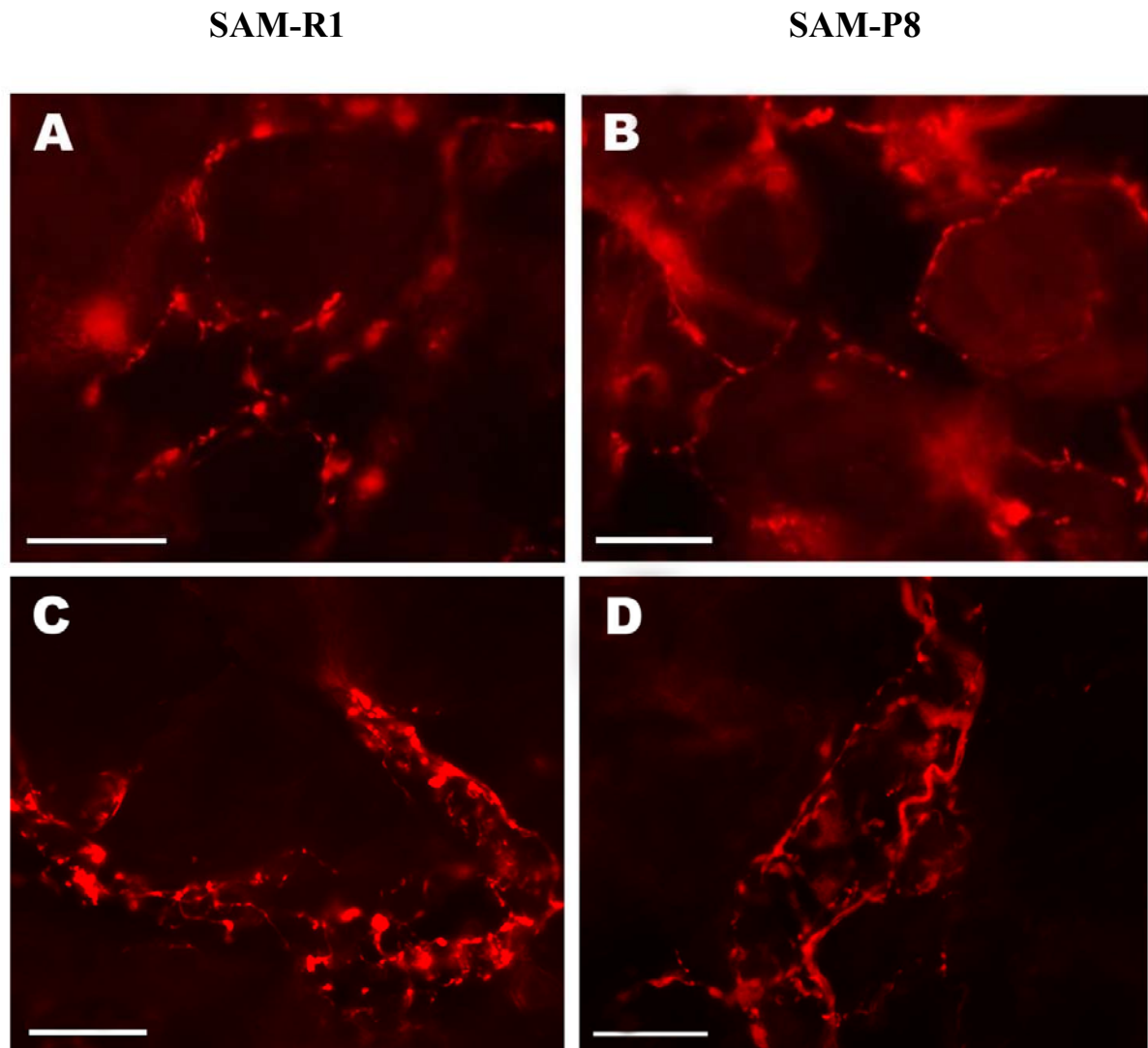


Figura 181. Detalles de estructuras inmunorreactivas a nNOS en cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*. Trabéculas de músculo liso de la zona cavernosa rodeadas por nervios nitrérgicos. *C* y *D*: Inervación perivascular en la zona cavernosa. Barra = 25 μ m.

4.4.5.3. Inervación adrenérgica

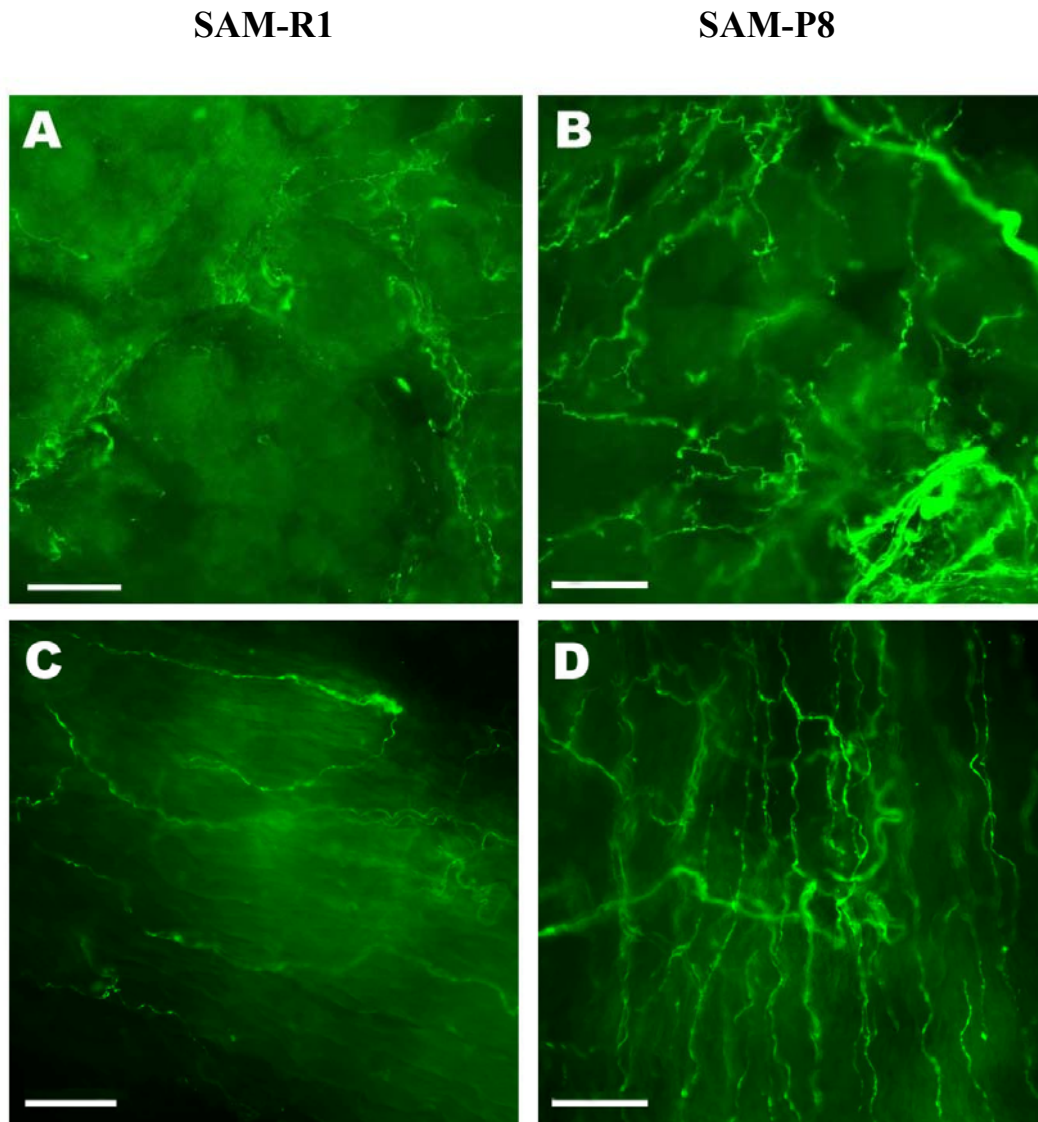


Figura 182. Inmunorreactividad a TSH en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8. **A** y **B**. Zona cavernosa. **C** y **D**. Túnica albugínea. En ambas zonas se observa un claro aumento de la inervación adrenérgica en SAM-P8 respecto a SAM-R1. Barra= 40 μ m.

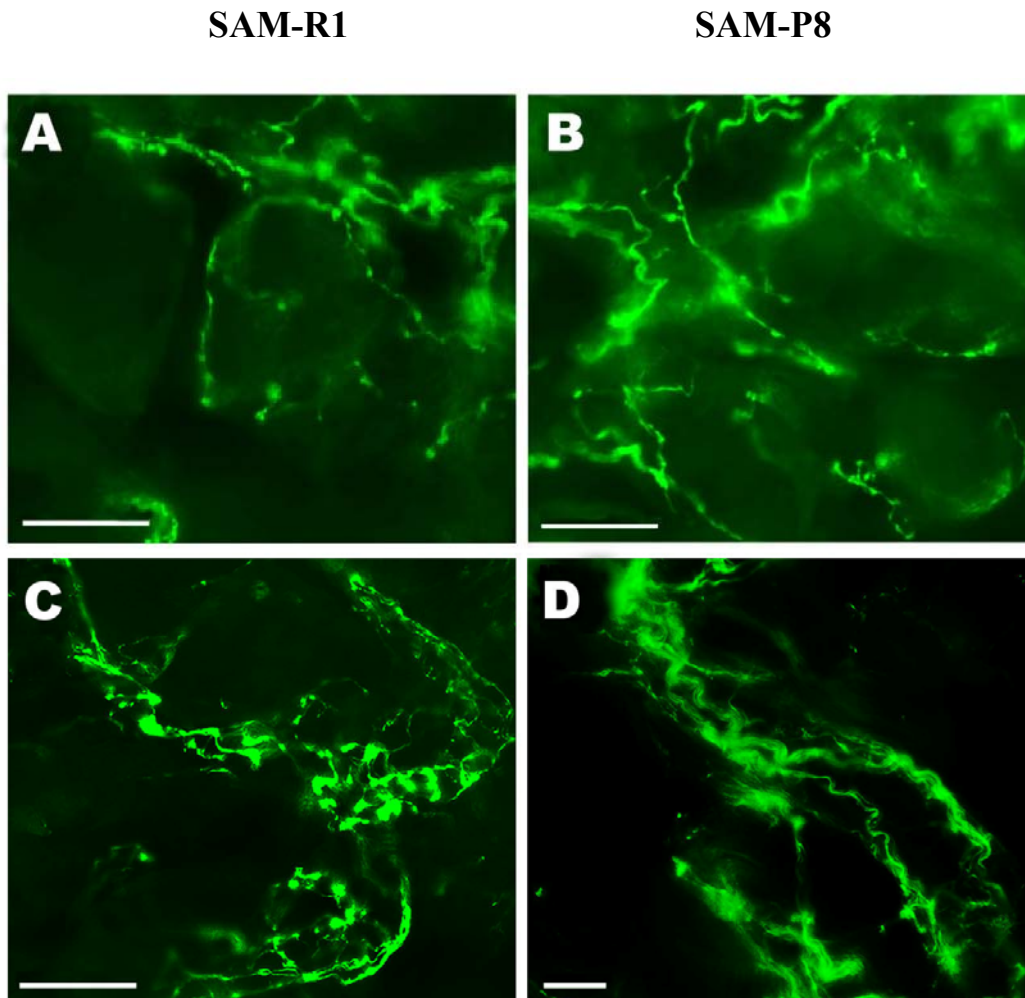


Figura 183. Detalles de estructuras inmunorreactivas a TSH en cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8. *A* y *B*. Se pueden apreciar las trabéculas de músculo liso de la zona cavernosa rodeadas por nervios adrenérgicos. *C* y *D*: Inervación perivascular en la túnica albugínea. Barra = 25 μ m.

4.4.6. Cambios en la inmunorreactividad a eNOS en el cuerpo cavernoso

SAM-R1

SAM-P8

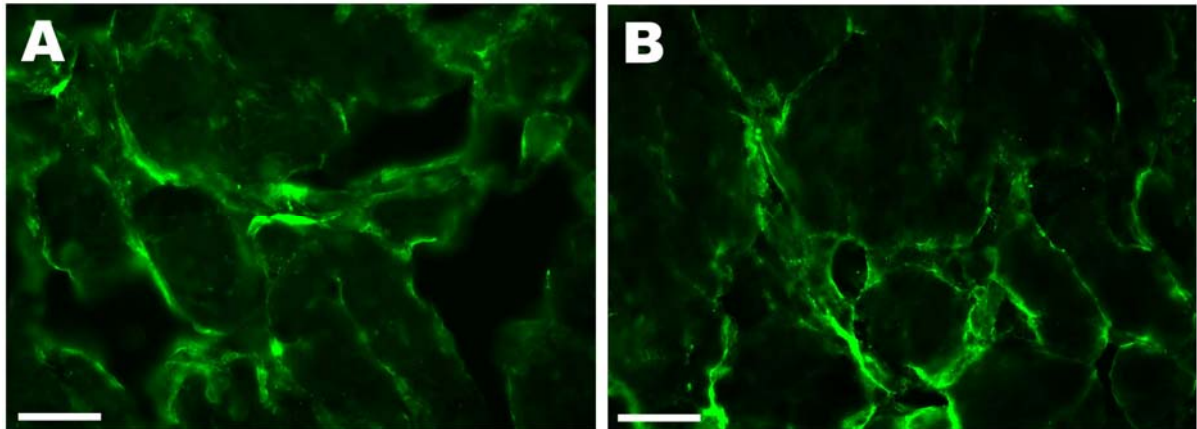


Figura 184. Inmunorreactividad a eNOS en cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 (**A**) y SAM-P8 (**B**). No se observan diferencias apreciables entre ambas estirpes de ratones en el marcaje endotelial. Barra= 50 μ m.

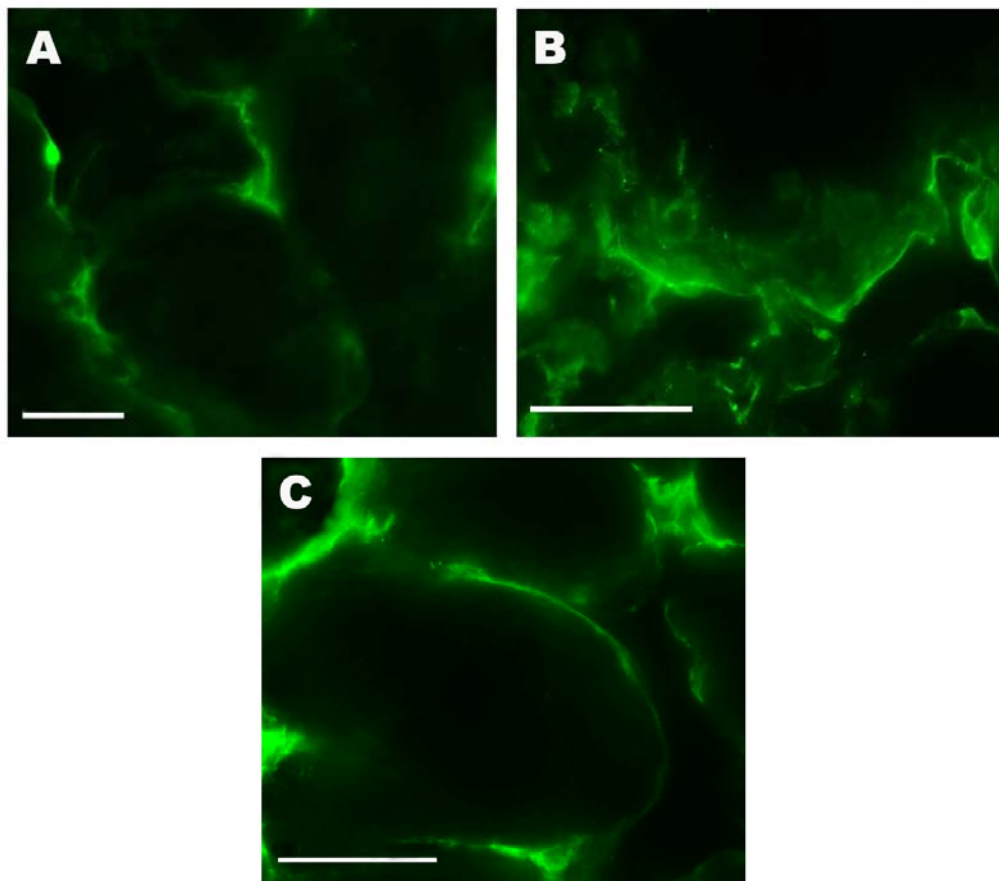


Figura 185. Detalles de estructuras inmunorreactivas a eNOS en cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 y SAM-P8. **A** y **B**. SAM-R1. **C**. SAM-P8. Se puede apreciar inmunorreactividad a eNOS en el endotelio recubriendo los espacios lacunares. Barra = 25 μ m.

4.4.7. Cambios en la densidad de ICCs del cuerpo cavernoso

4.4.7.1. Densidad de ICCs positivas a vimentina

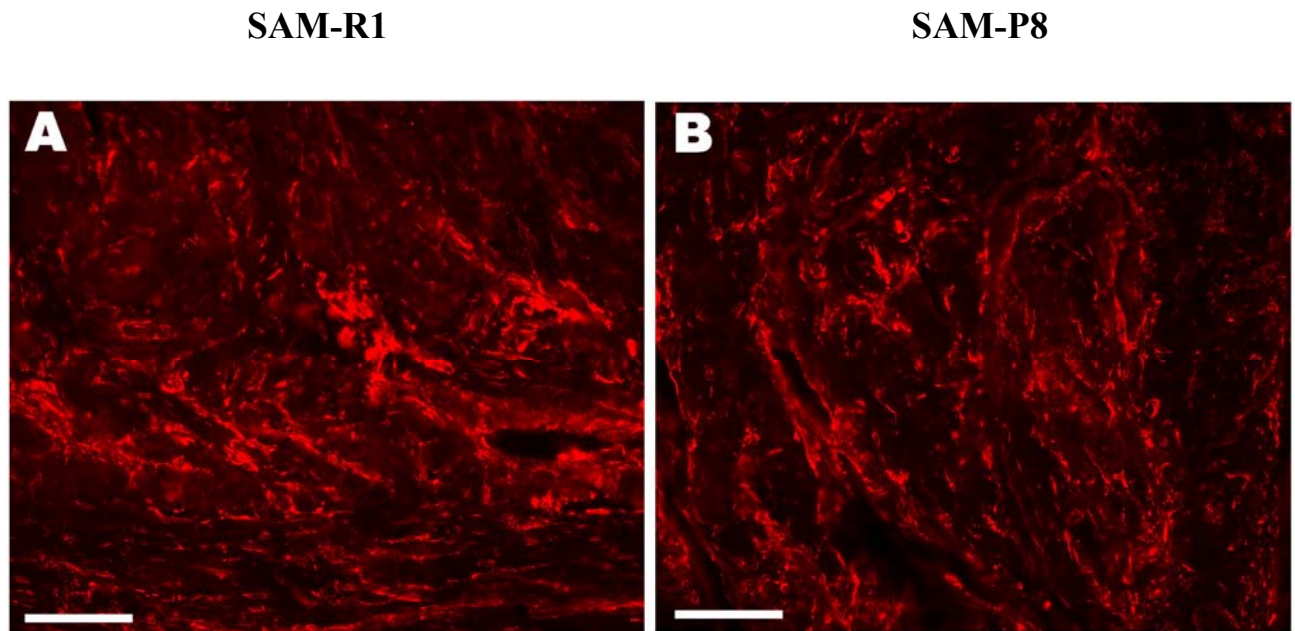


Figura 186. Inmunorreactividad a vimentina en cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 (**A**) y SAM-P8 (**B**). No se observan diferencias aparentes entre ambas estirpes de ratones. Barra= 50 μ m.

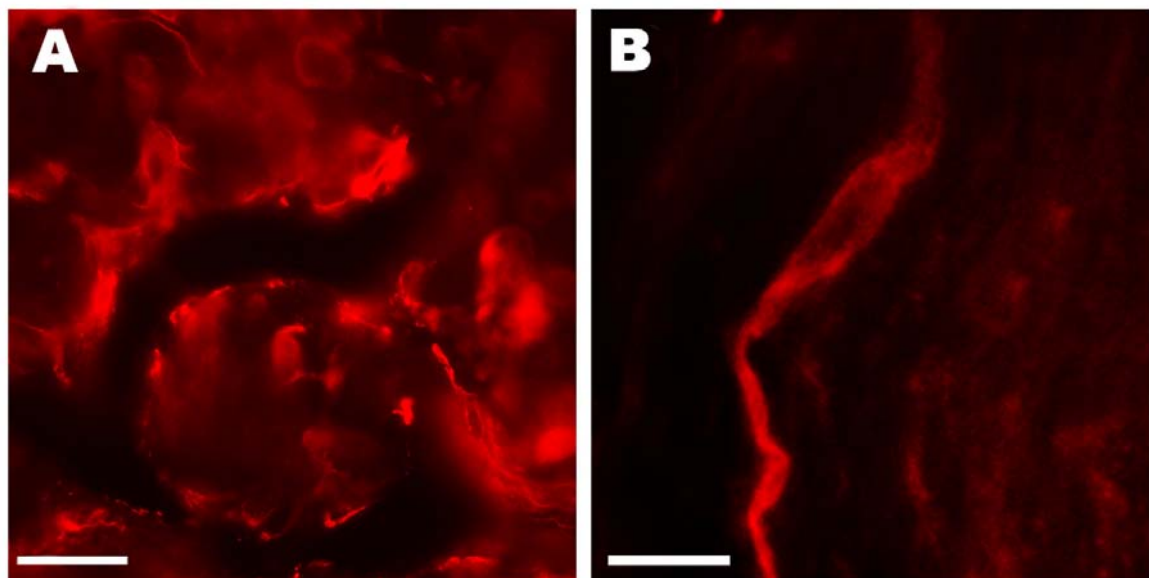


Figura 187. Detalles de estructuras inmunorreactivas a vimentina en cuerpo cavernoso de machos SAM-P8 (**A**) y SAM-R1 (**B**). **A.** Destaca la aparición de ICCs dentro de las trabéculas de músculo liso. La vimentina también marca el endotelio que bordea los espacios lacunares. **B.** ICC a grandes aumentos. Barra = 20 μ m (**A**) y 13 μ m (**B**).

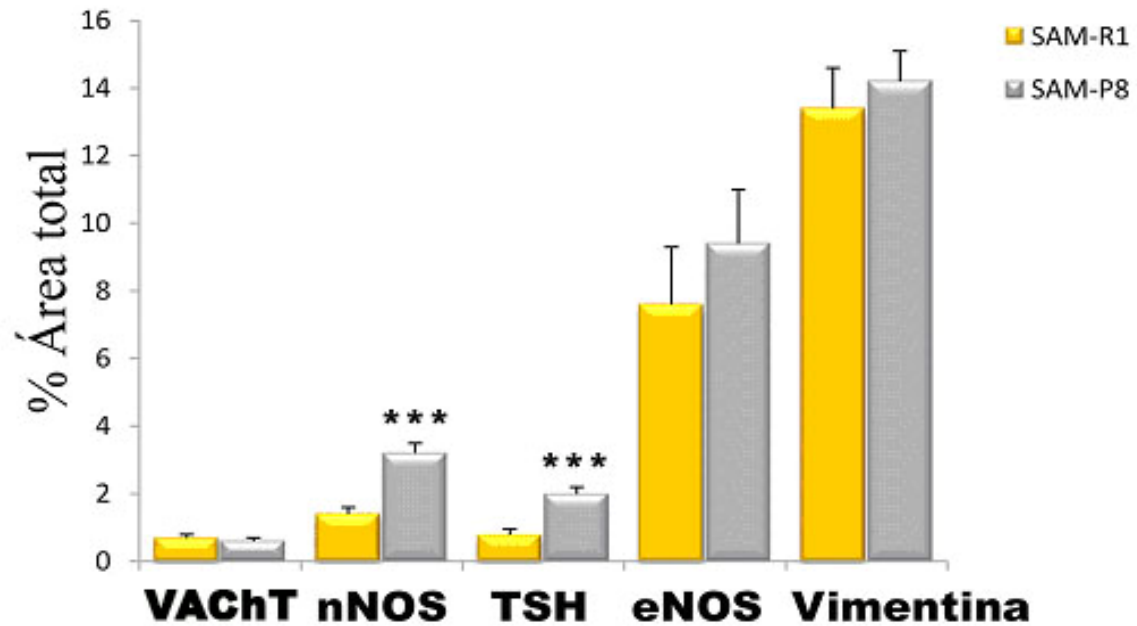
CUERPO CAVERNOSO

Figura 188. Cuantificación de la inmunorreactividad a VACHT, nNOS, TSH, eNOS y Vimentina en cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8. Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 7-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). *** $p<0,001$ señala diferencias significativas respecto a SAM-R1.

4.4.7.2. Inmunorreactividad a cGMP

4.4.7.2.1. Inmunorreactividad a cGMP inducida por DEA/NO o por EFS

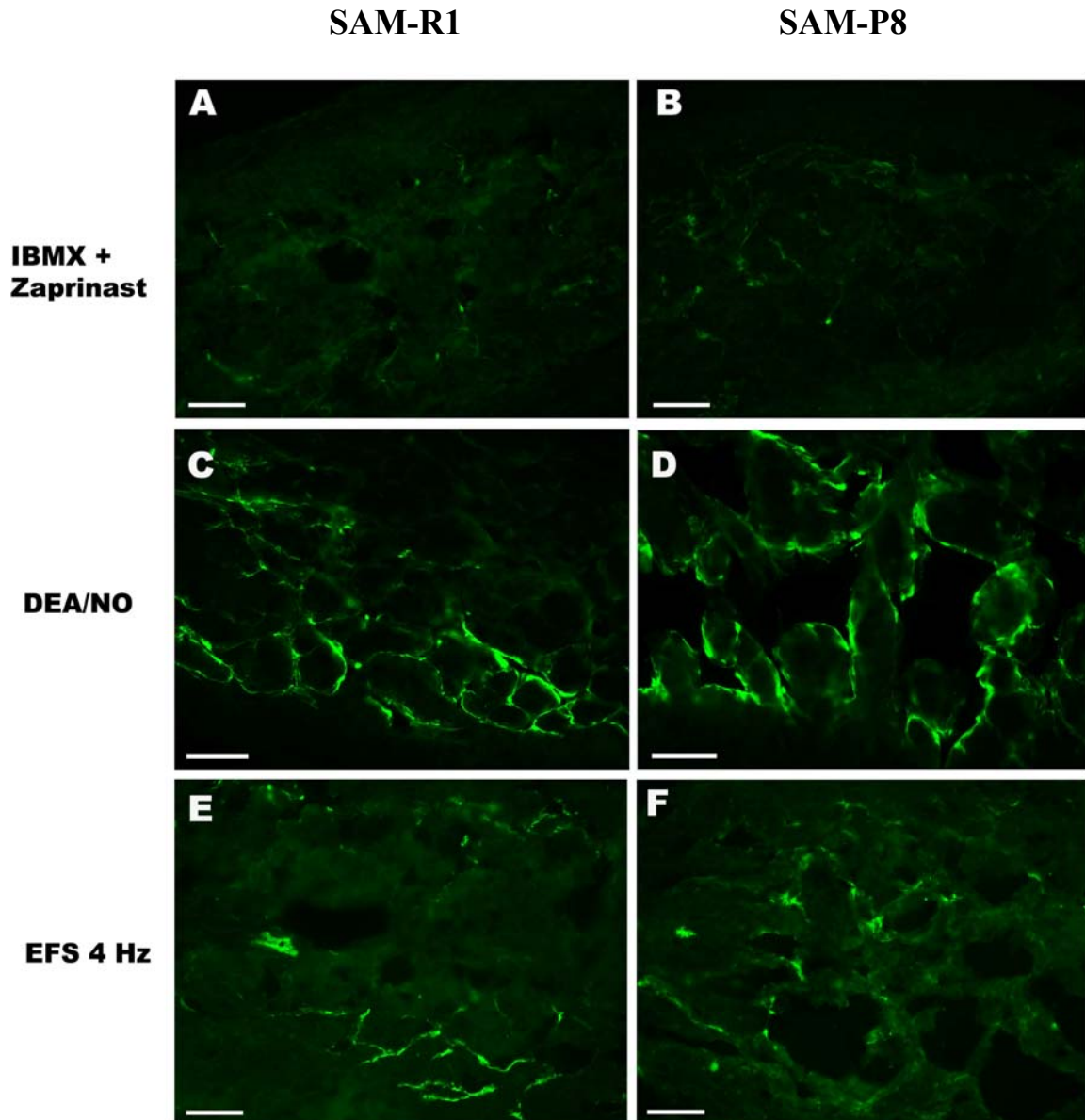


Figura 189. Inmunorreactividad a cGMP en cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de machos SAM-R1 (**A**, **C** y **E**) y SAM-P8 (**B**, **D** y **F**). **A** y **B**. Inmunorreactividad basal en presencia de los inhibidores de PDE: IBMX y Zaprinast (ambos a 0,1 mM). **C** y **D**. Inmunorreactividad inducida por DEA/NO (0,1 mM) en presencia de inhibidores de PDE. **E** y **F**. Inmunorreactividad inducida por EFS (4 Hz, 4 min) en presencia de inhibidores de PDE. No se observan diferencias entre ratones SAM-R1 y SAM-P8 en ninguno de los 3 casos. En cambio, se aprecia claramente la escasa inmunorreactividad a cGMP en presencia exclusivamente de IBMX y Zaprinast comparada con la observada en preparaciones estimuladas con DEA/NO y EFS (4 Hz). Barra= 50 μ m.

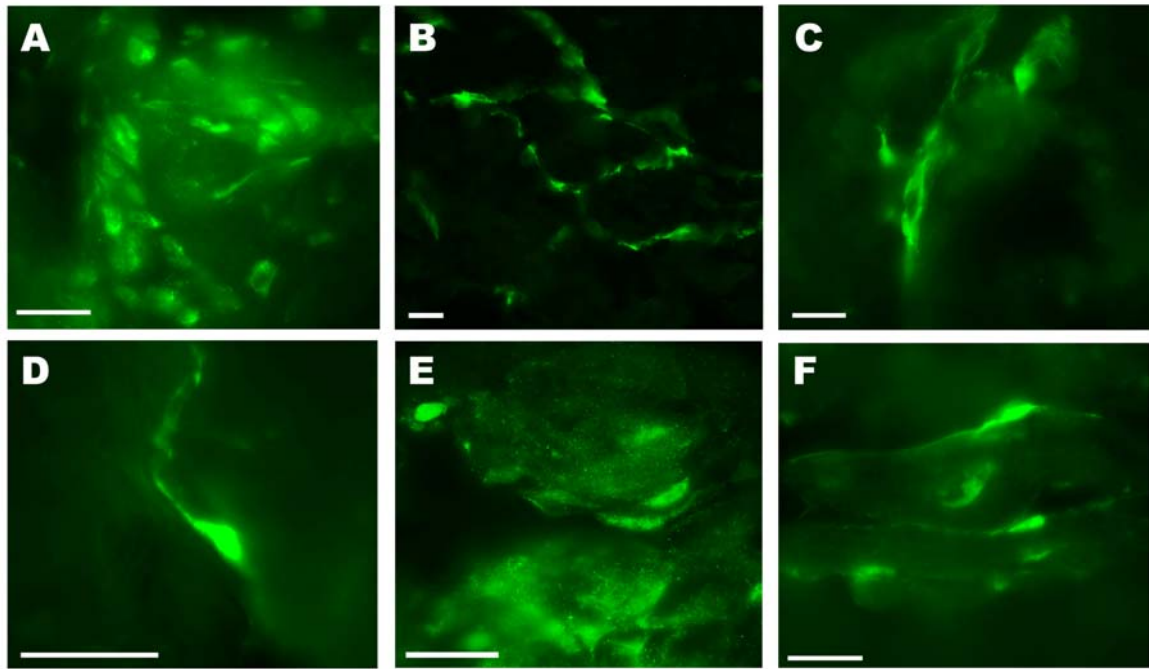


Figura 190. Detalles de estructuras inmunorreactivas a cGMP en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 estimuladas con EFS 4 Hz. *A.* Células musculares en SAM-P8. *B.* *C* y *D.* ICCs entre trabéculas de músculo liso en SAM-R1. *E.* ICCs bordeando una trabécula de músculo liso en SAM-P8. *F.* Estructuras perivasculares en SAM-P8 (posibles pericitos). Nótese el aspecto fusiforme de las ICCs en el cuerpo cavernoso. Barra = 13 μ m.

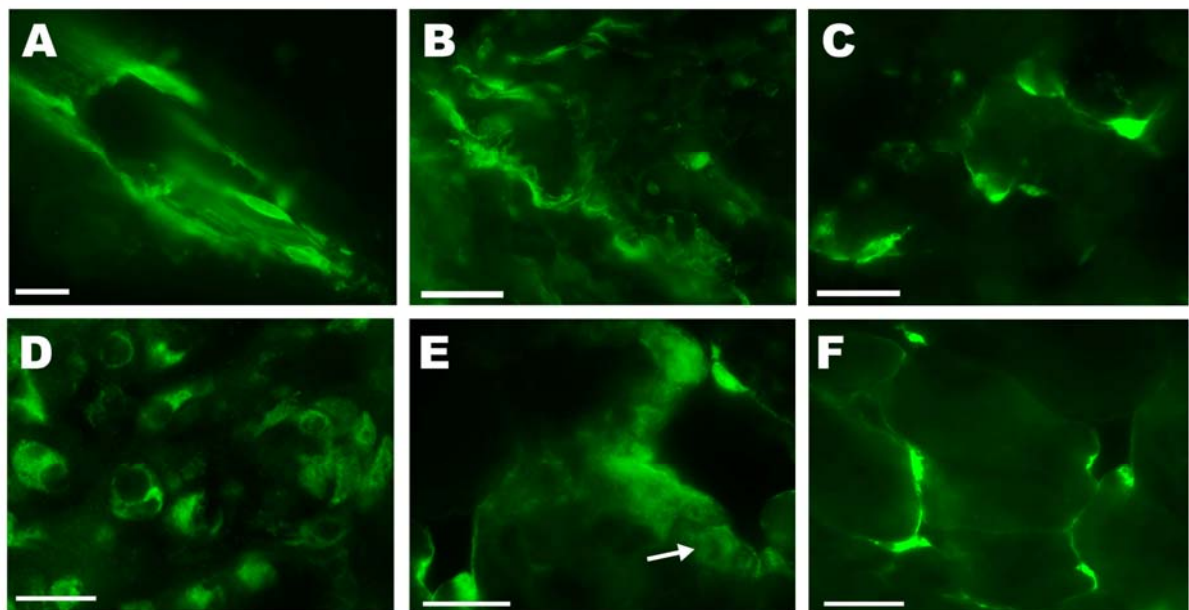


Figura 191. Detalles de estructuras inmunorreactivas a cGMP en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 estimuladas con DEA/NO (0,1 mM). *A.* Estructura perivascular (posibles pericitos) en SAM-R1. *B.* ICCs en la zona de la túnica albugínea en SAM-P8. *C.* ICCs bordeando trabéculas de músculo liso en SAM-P8. *D.* Células musculares lisas en SAM-P8. *E* y *F.* ICCs bordeando trabéculas de músculo liso en SAM-R1. Nótese en *E* como algunas células musculares también son inmunorreactivas a cGMP, la flecha señala una de ellas. Barra = 13 μ m.

4.4.7.2.2. Efecto de la inhibición de la GC (ODQ) y NOS (L-NOARG)

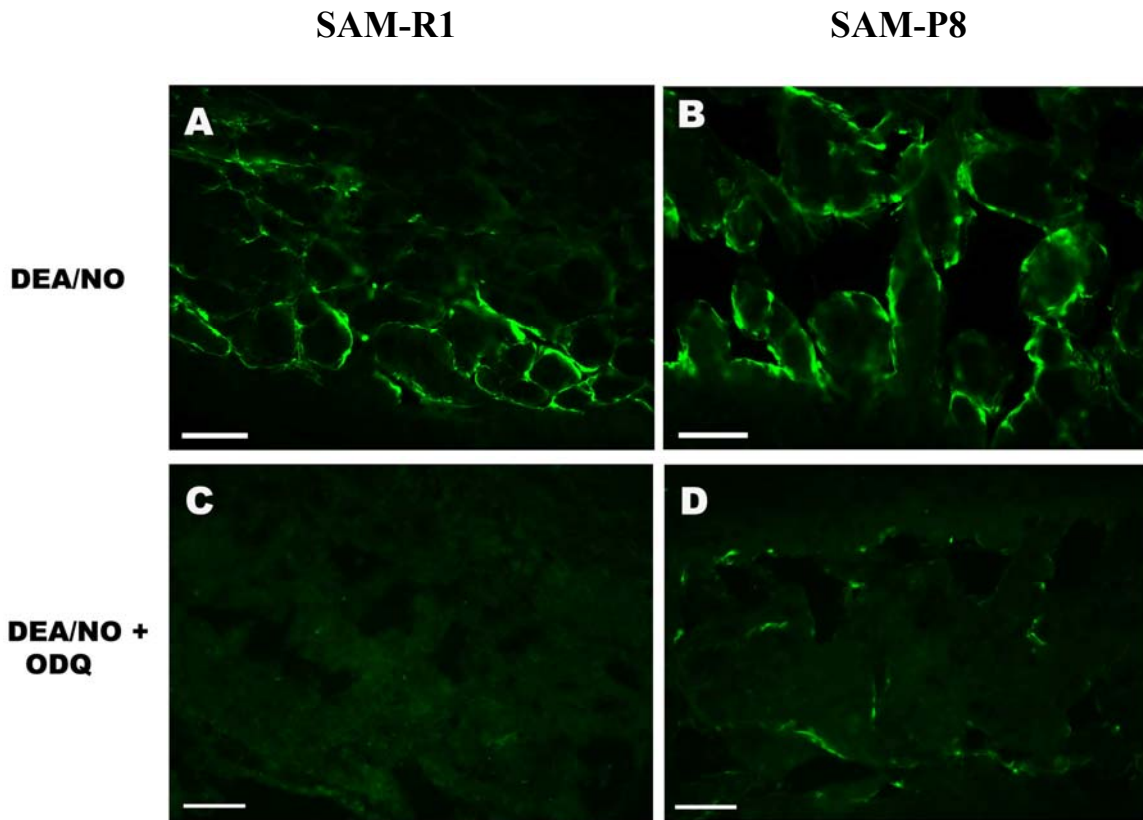


Figura 192. Inmunorreactividad a cGMP en cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 (**A y C**) y SAM-P8 (**B y D**) sometidos a DEA/NO (0,1 mM) en ausencia (**A y B**), y presencia (**C y D**) de ODQ (0,1 mM). Se observó como la presencia de ODQ redujo de forma muy marcada en SAM-P8 o inhibió por completo en SAM-R1 la inmunorreactividad a cGMP. Barra = 50 μ m.

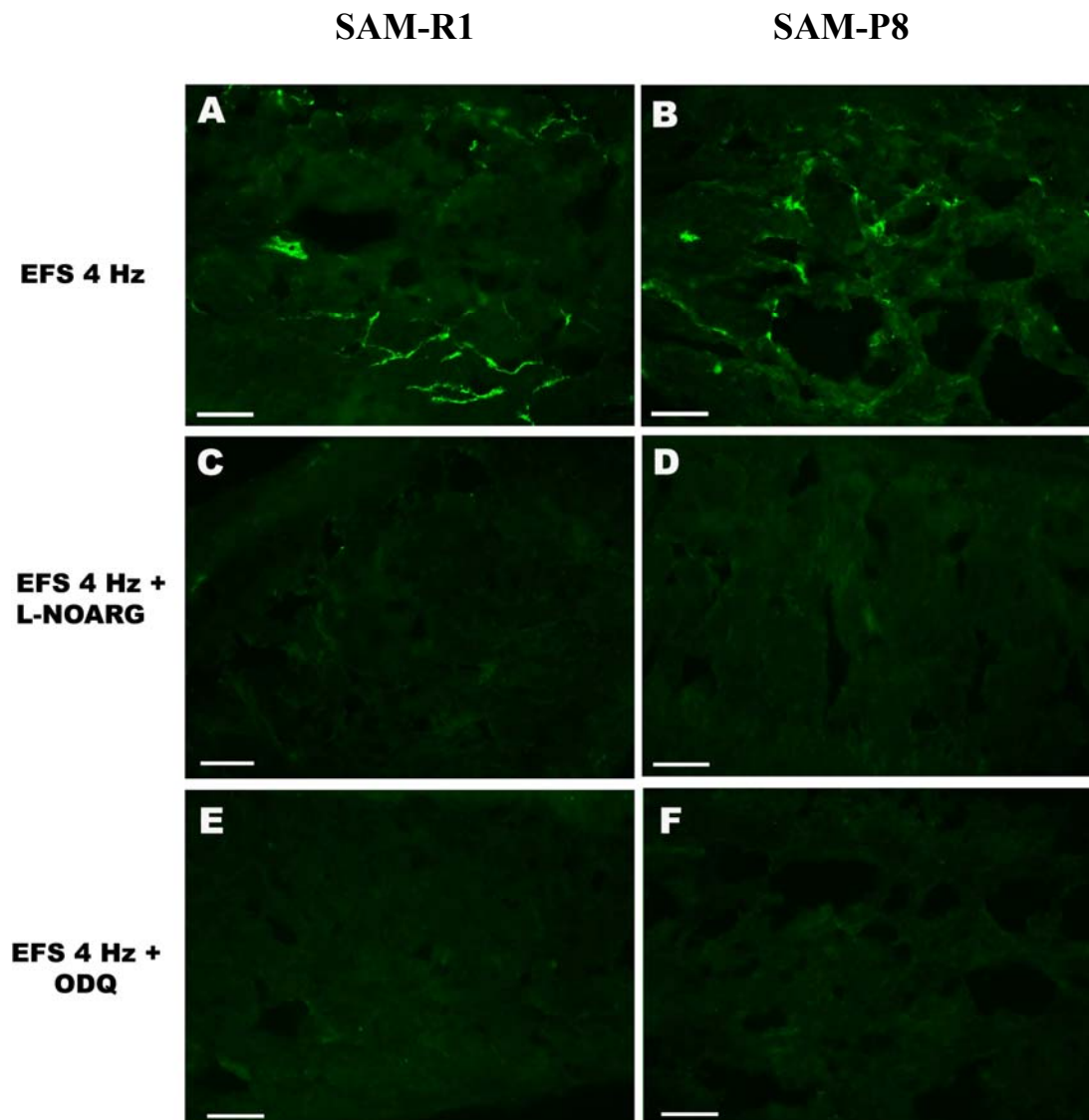


Figura 193. Inmunorreactividad a cGMP en cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 (**A**, **C** y **E**) y SAM-P8 (**B**, **D** y **F**) sometidos a EFS (4 Hz, 4 min) exclusivamente (**A** y **B**), o en presencia de L-NOARG (0,1 mM) (**C** y **D**) o de ODQ (0,1 mM) (**E** y **F**). Se puede apreciar la inhibición completa de la inmunorreactividad a cGMP en presencia de L-NOARG u ODQ. Barra= 50 μ m.

CUERPO CAVERNOSO

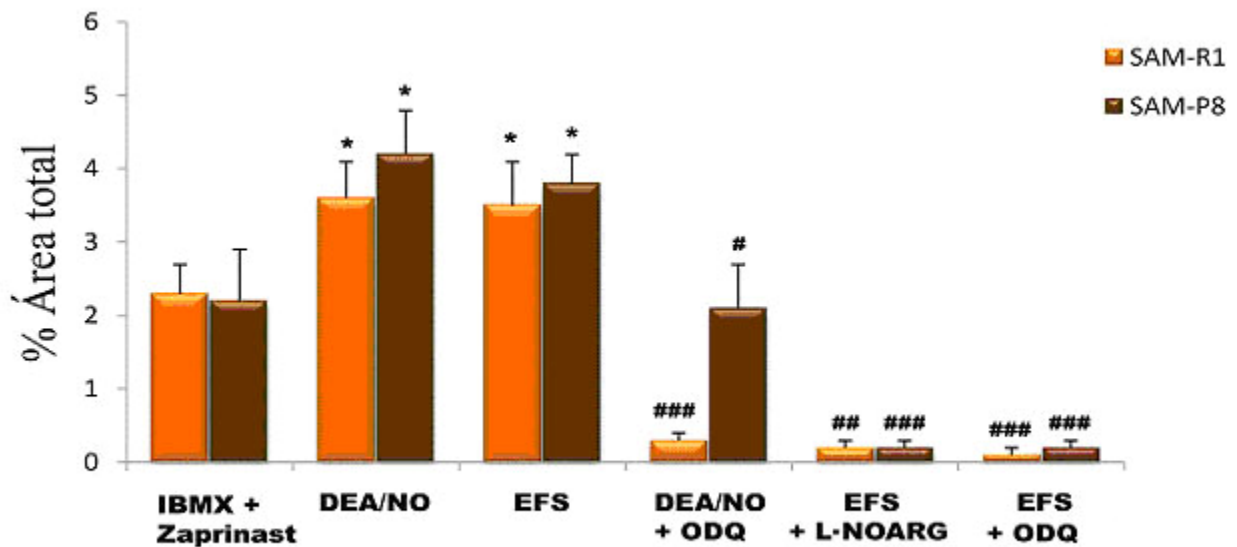


Figura 194. Cuantificación de la inmunorreactividad a cGMP en preparaciones de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8 sometidas a la adición exógena de DEA/NO (0,1 mM) o a EFS (4 Hz, 4 min) en presencia de IBMX y Zaprinast (0,1 mM ambos), y el efecto del ODQ o de L-NOARG sobre la misma (0,1 mM; 30 min ambos). La inmunorreactividad a cGMP control es la que se produce en presencia sólo de IBMX y Zaprinast (0,1 mM ambos). Los valores representan el porcentaje de área marcada con una intensidad superior al umbral, y están expresados como media \pm error estándar de la media ($n= 7-15$ campos a 20X de al menos 3 animales diferentes). * $p<0,05$ señala diferencias significativas respecto a la inmunorreactividad control (IBMX + Zaprinast) y # $p<0,05$, ## $p<0,01$ y ### $p<0,001$ respecto a DEA/NO o EFS 4 Hz sin inhibidores.

4.4.8. Estudios de colocalización en el cuerpo cavernoso

4.4.8.1. Relación entre diferentes neurotransmisores

a) Acetilcolina (VAcHT)- NO (nNOS)

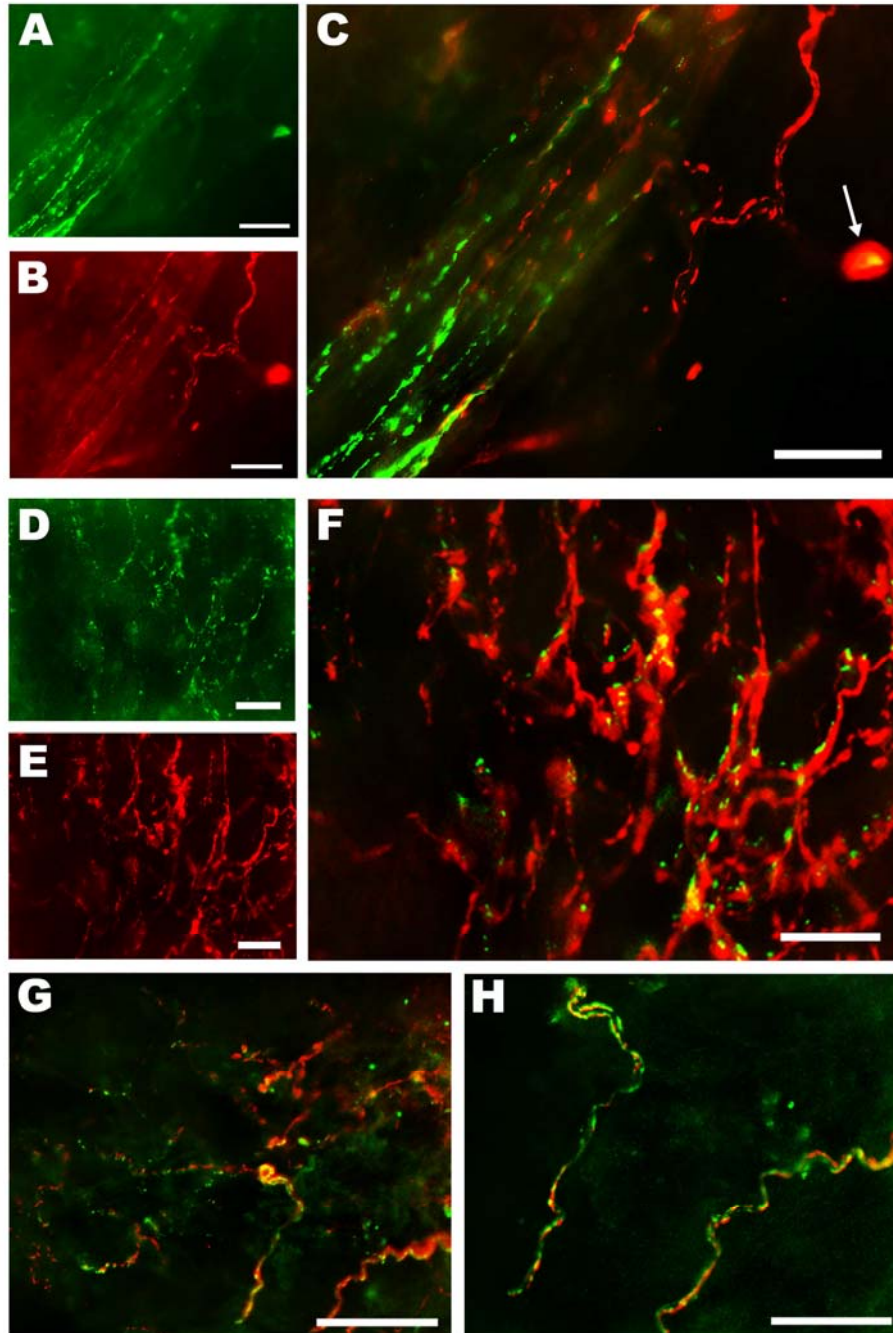


Figura 195. Doble marcaje para VAcHT (verde) y nNOS (rojo) en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 y SAM-P8. **A-C.** Zona de la túnica albugínea en SAM-R1 donde los nervios parecen discurrir paralelamente a las células musculares lisas. La flecha señala un posible ganglio intramural inmunorreactivo a ambos marcadores. **D-F, G y H:** Zona cavernosa en SAM-P8 donde se observa aparente colocalización en algunas terminaciones nerviosas pero no en otras. Barra = 25 μm.

b) Noradrenalina (TSH)- NO (nNOS)

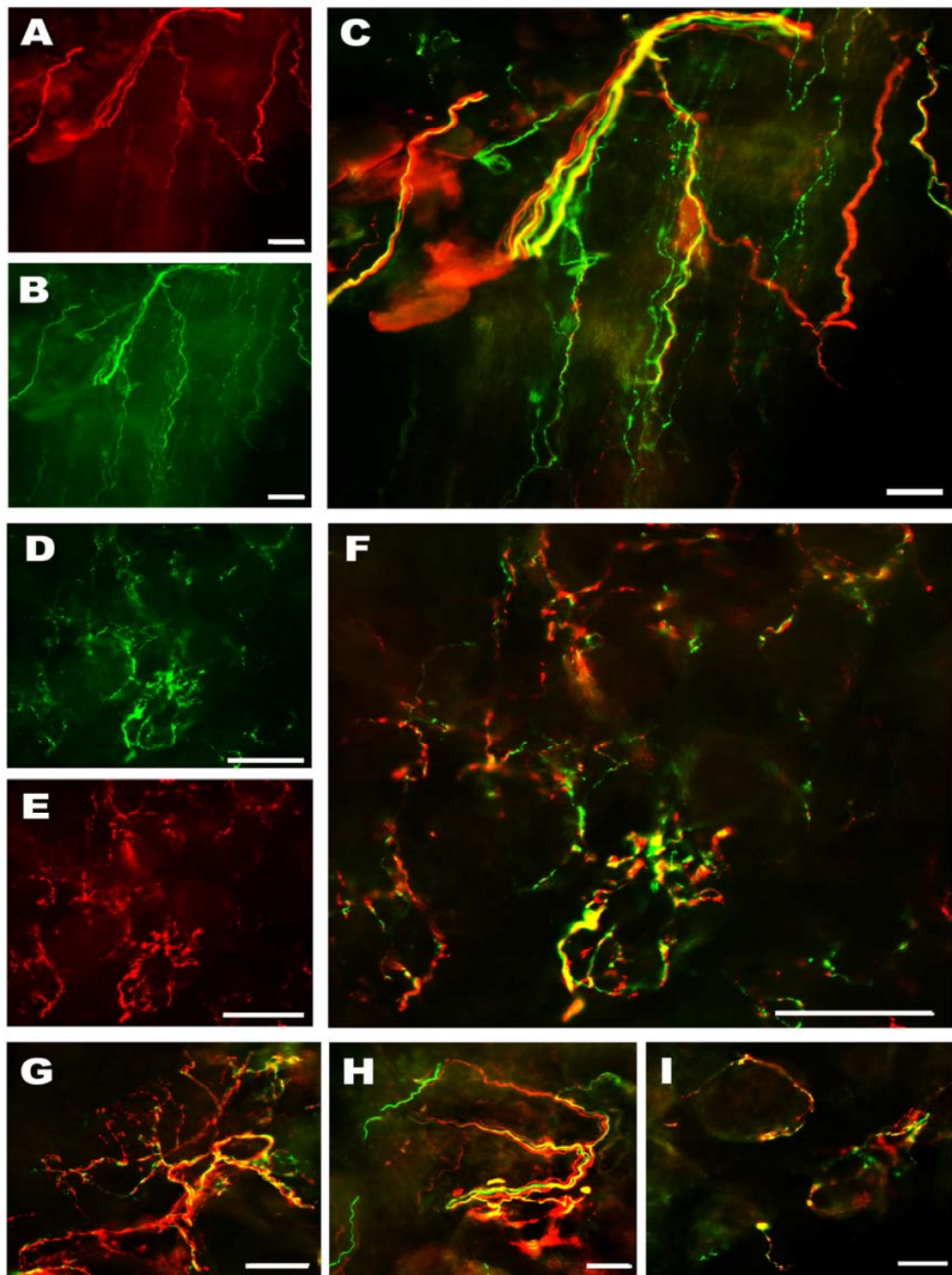


Figura 196. Doble marcaje para TSH (verde) y nNOS (rojo) en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso de ratones SAM-P8. **A-C.** Zona de la túnica albugínea. **D-F, G, H e I:** Zona cavernosa. En todos los casos se observa aparente colocalización en algunos troncos y terminaciones nerviosas pero no en otras. En **I** se aprecian las trabéculas de músculo liso bordeadas por ambos tipos de nervios. Barra = 25 μ m.

4.4.8.2. Relación entre ICCs positivas a vimentina y nervios intramurales

a) Vimentina- Acetilcolina (VACHT)

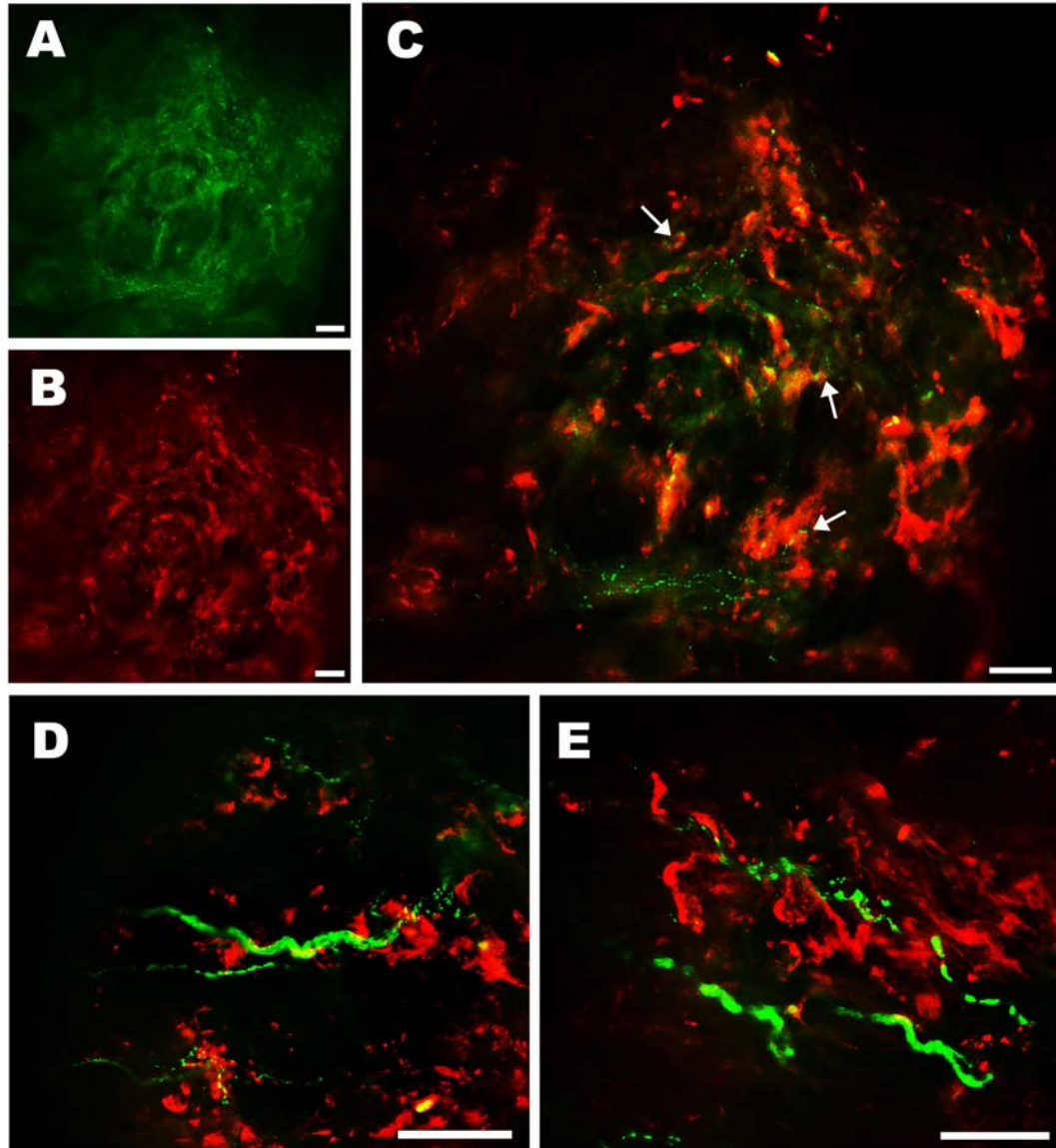


Figura 197. Doble marcaje para VACHT (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso de ratones SAM-P8. En **C**, **D** y **E** se aprecian puntos de contacto entre nervios colinérgicos y ICCs, algunos de ellos señalados con flechas en **C**. Barra = 25 μ m.

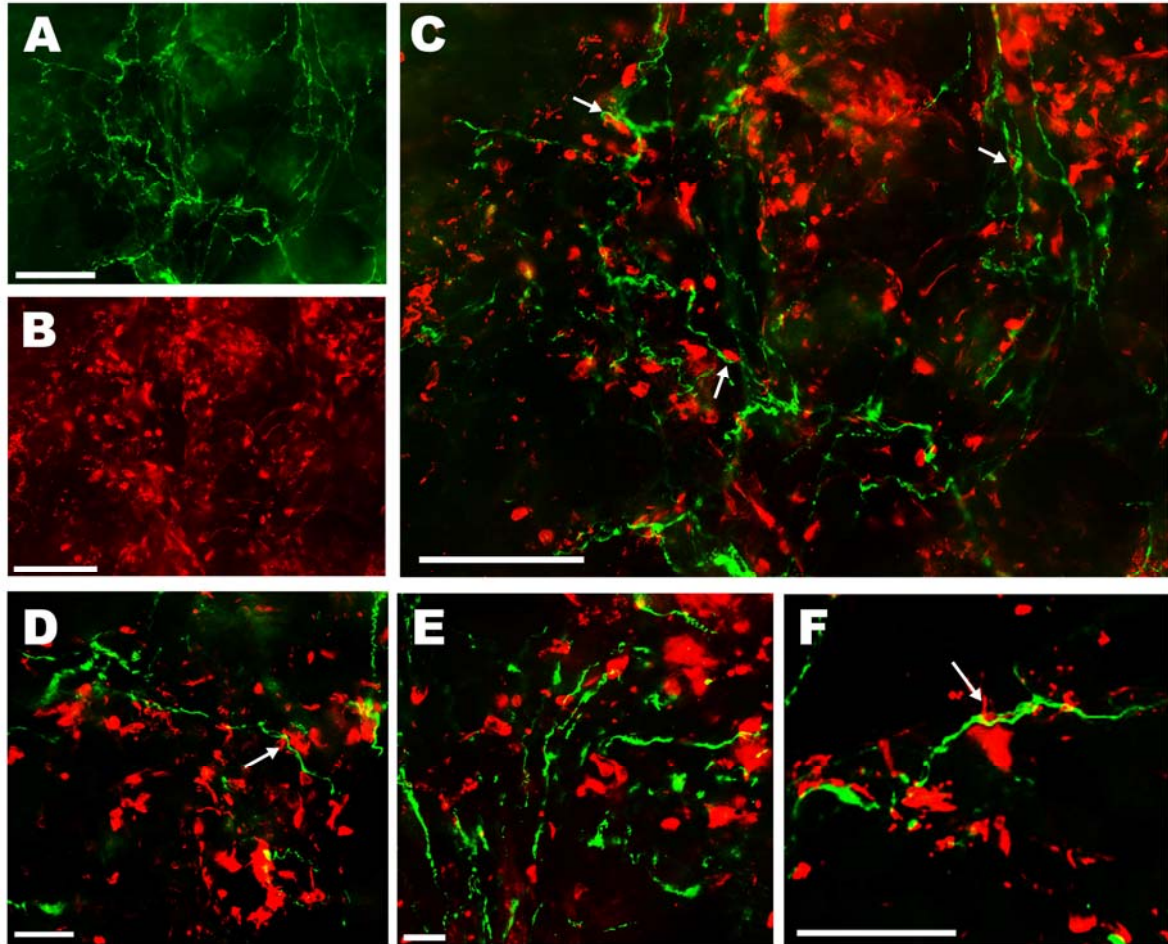
b) Vimentina- Noradrenalina (TSH)

Figura 198. Doble marcaje para TSH (verde) y vimentina (rojo) en preparaciones *whole-mount* de cuerpo cavernoso de ratones SAM-P8. En **C**, **D** y **F** se aprecian numerosos puntos de contacto entre nervios adrenérgicos y ICCs, algunos de ellos señalados con flechas. Barra = 50 μm (**A**, **B** y **C**) y 25 μm (**D**, **E** y **F**).

4.4.8.3. Relación entre ICCs positivas a vimentina y a cGMP

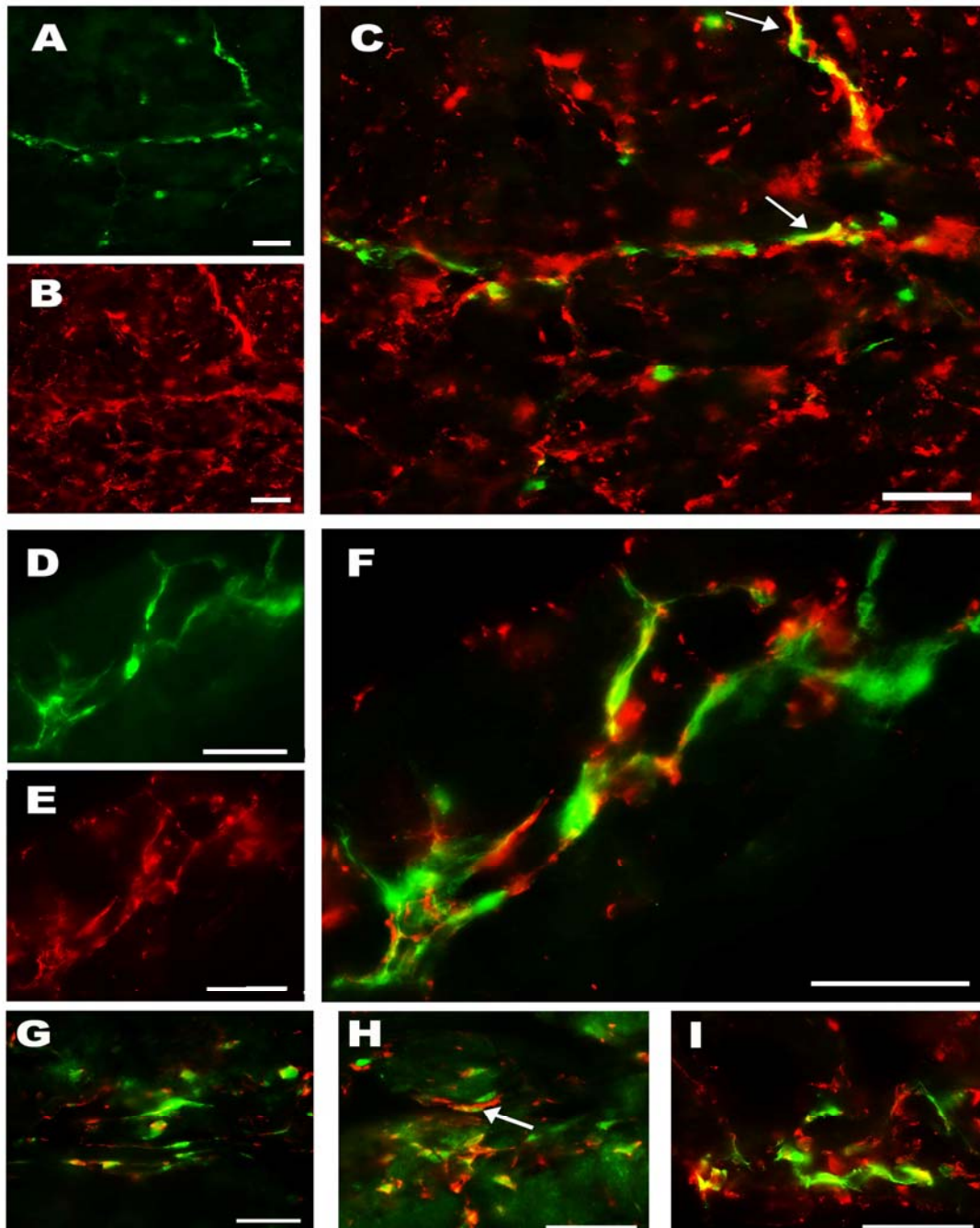


Figura 199. Doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo) en cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 (**A-C** y **D-F**) y SAM-P8 (**G**, **H** e **I**). Las preparaciones de cuerpo cavernoso han sido sometidas a tratamiento previo con EFS (4 Hz, 4 min). Se puede apreciar la colocación clara de ambos marcadores en algunas ICCs, tres de ellas señaladas con flechas. En **A-C** se observa la existencia de muchas ICCs aparentemente positivas a vimentina pero no a cGMP. En **H** destaca la existencia de ICCs inmunorreactivas a ambos marcadores bordeando las trábeculas de músculo liso. En **G** se observan estructuras perivasculares inmunorreactivas a ambos marcadores. Barra = 25 μ m.

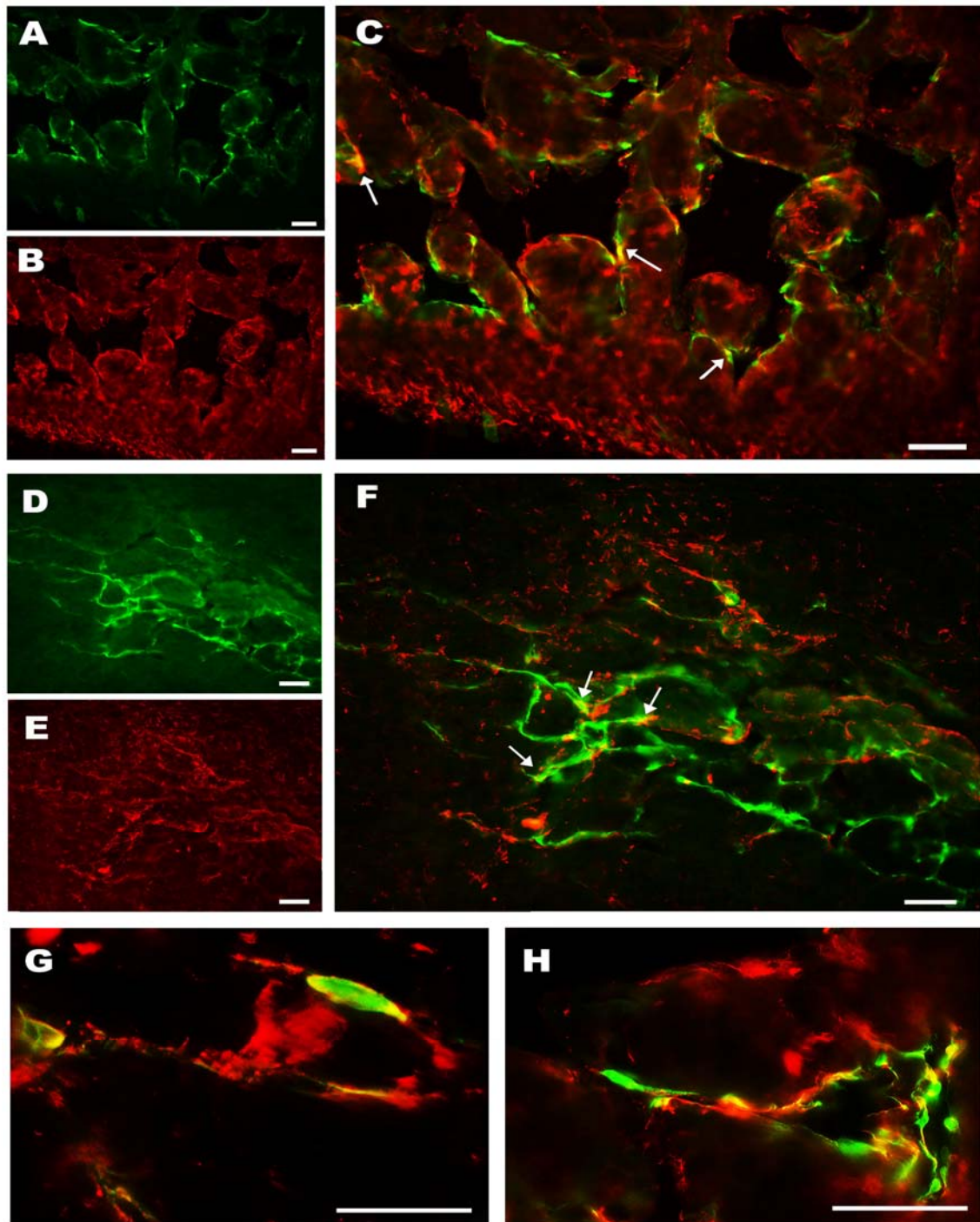


Figura 200. Doble marcaje para cGMP (verde) y vimentina (rojo) en cortes longitudinales de cuerpo cavernoso de ratones SAM-R1 (**D-F** y **G**) y SAM-P8 (**A-C** y **H**). Las preparaciones de cuerpo cavernoso han sido sometidas a tratamiento previo con DEA/NO. **A-C**, **D-F** y **H**: Se puede observar la disposición de ICCs bipolares rodeando las trabéculas musculares en las que colocan ambos marcadores en algunos casos (flechas) pero no en otros. Nótese en **G** como en la misma célula, el marcaje de vimentina es más periférico mientras que el marcaje de cGMP se localiza también en el citoplasma. Barra = 25 μ m (**A-C**, **D-F** y **H**) y 13 μ m (**G**).